N° d'ordre : AO 7241

THÈSE

Présentée à

L'U.E.R. EXPERIMENTALE ET PLURIDISCIPLINAIRE DE LUMINY DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Paule CHEVILLOTTE

Consommation d'Oxygène dans les Cellules Végétales *in vivo*. Rôle de la Diffusion.

Soutenue le Juillet *1972* devant la Commission d'Examen :

A. PENELOUX	Président
G. L. DUCET	Examinateurs
M. THELLIER	
J. LAVOREL	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547004_0003

N° d'ordre : AO 7241

THÈSE

Présentée à

L'U.E.R. EXPERIMENTALE ET PLURIDISCIPLINAIRE DE LUMINY DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Paule CHEVILLOTTE

Consommation d'Oxygène dans les Cellules Végétales *in vivo*. Rôle de la Diffusion.

Soutenue le Juillet **1972** devant la Commission d'Examen :

A. PENELOUX	Président
G. L. DUCET	Examinateurs
M. THELLIER	
J. LAVOREL	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT - PROPOS

Des remerciements.

J'avoue avoir été d'abord un peu rebutée par l'aspect formaliste de cette page, et cependant l'omettre pourrait sembler signifier que ce travail s'est fait indépendamment de tout un environnement que constitue le milieu du laboratoire et les multiples contacts qui à travers les échanges permettent d'éclaicir ou de remettre en question ses propres idées. Aussi après avoir dit que ce travail avait été effectué au laboratoire de Physiologie Cellulaire de Luminy, je souhaiterais remercier ici tous ceux qui m'ont apporté leur aide, notamment :

- Mon Directeur de recherches, Monsieur DUCET, qui m'a permis d'accéder au domaine de la Physiologie Cellulaire, assurant l'essentiel de ma formation de chercheur, et qui a su m'accorder à la fois d'utiles critiques et une grande liberté dans l'organisation de ce travail.

- Monsieur PENELOUX, Professeur de Physique-Chimie, qui ayant abordé il y a quelques années ces problèmes de diffusion dans les cellules végétales, a accepté de s'y intéresser à nouveau et de présider ce jury.

- Monsieur THELLIER, pour s'être intéressé à ces recherches et pour sa participation à ce jury.

- Monsieur LAVOREL avec qui j'ai eu l'occasion de discuter de mon travail à plusieurs reprises et qui a bien voulu également venir à ce jury malgrè de très nombreuses occupations.

- Monsieur Francis MARTY, du laboratoire de Cytologie Végétale, pour avoir très cordialement accepté de faire des observations de microscopie.

- L'équipe du CENTRE DE CALCUL de St. Jérôme pour l'entre-aide, la bonne humeur qui y règne.

- Mademoiselle Nadia OLIVERI pour toute l'aide qu'elle a apporté à la réalisation pratique de ce manuscrit, avec une infinie patience.

- Mes camarades de laboratoire, Madame VITALE, pour leur aide, leur sympathie.

- Mes amis du C.A. du C. N. R. S. pour leurs suggestions, leurs critiques, les discussions, l'amitié.

page

INTRODUCTION 3

1. Problème posé 3
2. Démarche globale utilisée 5

I - FAITS EXPERIMENTAUX DE DEPART ET HYPOTHESES. 10

1.1. - Données expérimentales initiales 10
1.2. - Choix des hypothèses 16

II - CONSTRUCTION DE MODELES M 19

2.1. - Premier modèle : sphère homogène 20
2.2. - Deuxième modèle : cellule à grande vacuole centrale 23
2.3. - Modèles à trois zones concentriques 26
2.31 - Expression analytique du modèle 27
2.32 - Exploitation numérique 31
2.4. - Observations au microscope et conclusion 39

III - ACTION DE L'OXYDE DE CARBONE : UTILISATION DU MODELE RETENU POUR PREVOIR LE COMPORTEMENT DANS LA TRANSFORMATION T. 43

3.1. - Au niveau mitochondrial 43
3.2. - Au niveau des cellules in vivo 44

IV - VERIFICATION EXPERIMENTALE 52

V - VERIFICATION OU EXPLICITATION DES PRINCIPALES HYPOTHESES UTILISEES. 60

5.1. - Vérification de l'hypothèse H_j^1 : "K_m" indépendant de $(pO_2)_{50}$ 60

5.11 - Principe 60

5.12 - Matériel et méthode 61

5.13 - Résultats 63

5.2. - Explicitation de l'hypothèse

$H_j^2 : V = \frac{V_m C}{K_m + C}$ 63

5.21 - Coefficient 1,4 de BAENDER et KIESE (1955) 64

5.22 - Mesure du taux d'oxydation de l'oxydase terminale "in vivo" 72

5.3. - Discussion de l'hypothèse H_j^2 : $D_e \gg D_i$. Construction de modèle à deux phases 74

5.31 - Données de bibliographie sur les coefficiens de diffusion 74

5.311. Coefficient de KROGH 75

5.312. Coefficient de diffusion mesuré dans l'espace extra-cellulaire 75

5.313. Dans le cytoplasme dépourvu de membrane 76

5.314. Dans les membranes 76

5.315. Dans le cytoplasme ayant des structures membranaires 77

5.32 - Modèle à deux phases de diffusion de l'oxygène dans un tissu hétérogène qui respire 77

5.321. Modèles précédents 77
5.322. Modèle proposé 79
5.323. Application de ce modèle aux données de LONGMUIR et BOURKE (1960) 87

VI - CONFRONTATION AVEC D'AUTRES MODELES 93

6.1. - Modèles proposés par SCHINDLER -Thèse 1964- 93
6.11 - Pente 1,4 de BAENDER et KIESE 95
6.12 - Cinétique aux très faibles concentrations d'oxygène 96
6.13 - Comportement en présence d' d'oxyde de carbone 97
6.14 - Choix de SCHINDLER et analyse dela démonstration de WINZLER 98
6.15 - Compatibilité du schéma M retenu avec les faits connus 101
6.16 - Identité du schéma M et du cas VII de LINEWEAVER et BURK (1934) 102
6.2. - Modèles de "diffusion facilitée" 103
6.3. - Modèles postulant une oxydase supplémentaire à faible affinité pour l'oxygène 108

CONCLUSION 112

BIBLIOGRAPHIE 115

LISTE DES FIGURES

Note : Pour des raisons techniques, il n'a pas été en général possible de placer la légende explicative sous la figure, et elle se trouve au verso de la page portant le schéma.

page

Fig. 1 - Schématisation de la démarche globale utilisée. 9

Fig. 2 - Modèle N° 2 à grande vacuole centrale 25

Fig. 3 - Deuxième modèle de cellule sphérique : influence d'une vacuole centrale 33

Fig. 4 et 5 - Variation de la vitesse de respiration d'une cellule en fonction de la concentration en oxygène 34

Fig. 6 et 7 - Variation de la vitesse de respiration d'une cellule en fonction de la concentration en oxygène 35

Fig. 8 - Gradient de concentration à l'intérieur d'une cellule, dans le cas d'un régime stationnaire 45

Fig. 9 - Respiration dans l'air 49

Fig. 10 - Respiration dans l'air et dans un mélange (CO,O_2) contenant une forte proportion de CO 50

Fig. 11 - Respiration dans un mélange (CO,O_2) contenant une plus faible proportion de CO 51

Fig. 12 - Variation de la vitesse de respiration en fonction de la concentration en oxygène dans la sixième heure après la coupe 55

Fig. 13 - Variation de la vitesse de respiration en fonction de la tension d'oxygène au cours de la onzième heure après la coupe 56

Fig. 14 - Variation de la vitesse de respiration en fonction de la tension en oxygène au cours de la quatorzième heure après la coupe 57

Fig. 15 - Inhibition de la respiration par l'oxyde de carbone au cours de la deuxième heure de survie 58

Fig. 16 - Mesures de vitesses de respiration des levures en fonction de la concentration en oxygène 59

Fig. 17 - K_m apparent déduit des mesures expérimentales en fonction de la concentration en inhibiteur 62

Fig. 18 - Représentation de $V/(V_m - V)$ en fonction de C pour les mitochondries de foie de rat d'après les données de BAENDER et KIESE 66

Fig. 19 - Données de BAENDER et KIESE dans une représentation en (1/V, 1/C) 70

Fig. 20 - Données de BAENDER et KIESE dans une représentation en (V, V/C) 71

Fig. 21 - Spectres de différences de levures pour lesquelles $V_m = R_m$ 73

Fig. 22 - Variation de la concentration critique de tranches de foie de rat (Cs) en fonction de l'épaisseur de la tranche (h) : $Cs/Q = f(h^2)$, d'après les données de LONGMUIR et BOURKE 90

Fig. 23 - $Cs = f(Q_m \times h)$ d'après les données de LONGMUIR et BOURKE 91

Fig. 24 - $(Cs/Q_m) = f(h)$ d'après les données de LONGMUIR et BOURKE 92

Fig. 25 - Respiration de tranches de foie en fonction de la concentration en oxygène Effet de la survie 105

PRINCIPAUX SYMBOLES UTILISES

Pour faciliter l'exposé, nous attribuerons aux différents symboles les significations suivantes :

V : Vitesse de respiration = dC/dt.

R_m : Vitesse maximum expérimentale.

V_m : Vitesse maximum qui correspondrait théoriquement à une oxydation totale de l'enzyme terminal et que l'on peut déduire des courbes en (V, V/C) ou (1/V, 1/C).

C : Concentration du substrat en Moles d'O_2.

CO : Concentration en oxyde de carbone.

I : Concentration en inhibiteur.

C_i : Concentration critique en dessous de laquelle la respiration est modifiée par la diffusion en présence d'un inhibiteur (mélange (CO, O_2)).

C_r : Concentration critique en dessous de laquelle la respiration décroît dans l'air.

$(pO_2)_{50}$: Concentration mesurée expérimentalement, quand la vitesse de respiration est égale à la moitié de sa valeur maximum expérimentale.

K_m : Concentration (théorique) de substrat, correspondant à la moitié de la vitesse définie ci-dessus ($V_m/2$).

K_i : Constante de dissociation enzyme-inhibiteur.

K_{co} : Constante de dissociation de l'oxyde de carbone et de l'enzyme.

$K_{m\ ap}$: Concentration théorique de substrat correspondant à la moitié de la vitesse maximum en présence d'oxyde de carbone.

n : Rapport de la respiration inhibée à celle dans l'air.

D_e : Coefficient de diffusion extra-cellulaire.

$D = D_C$: Coefficient de diffusion de l'oxygène dans la cellule.

R : Rayon moyen d'une cellule.

r : Distance au centre d'une cellule.

Q : Consommation d'oxygène par unité de volume.

h : Demi-épaisseur d'une tranche de tissu.

e : Concentration en enzyme.

INTRODUCTION

L'un des problèmes que l'organisme a à résoudre est l'acheminement de l'oxygène depuis le milieu extérieur jusqu'au site d'utilisation, que ce soit au niveau du tissu, de la cellule, de l'enzyme. L'étude du (ou des) facteur de transfert de l'oxygène ne peut être abordée que dans les conditions où il devient facteur limitant la consommation d'oxygène, et un certain nombre d'implications théoriques et pratiques sont liées à l'étude de la respiration cellulaire aux faibles tensions d'oxygène.

1- Problème posé.

La question que nous avons abordée est de savoir quels sont les phénomènes limitant la vitesse de respiration dans les mélanges oxygène-azote aux faibles concentrations d'oxygène. Cela implique de délimiter le rôle joué par les processus purement physiques, telle la diffusion de l'oxygène, et par des processus chimiques liés à l'activité métabolique de la cellule. Cela nécessite de s'interroger sur la relation entre l'activité respiratoire, au niveau de la réaction cytochrome-oxydase-oxygène, et la consommation d'oxygène dans les cellules "in vivo".

L'idée la plus couramment admise est que la concentration critique d'oxygène, c'est-à-dire celle au-dessous de laquelle la respiration décroît, résulte de la limitation par des systèmes enzymatiques plutôt que d'une limitation par un processus de diffusion.

Cependant certains faits expérimentaux suggèrent un rôle possible de la diffusion. Par exemple :

- Dans le cas des levures, les représentations de la variation de la vitesse de respiration (V) en fonction de la concentration en oxygène (C) sous la forme (V, V/C) ou (1/V, 1/C) sont linéaires en présence de mélange oxyde de carbone-oxygène dans tout le domaine de concentration étudié (CHEVILLOTTE 1966) -ce qui pourrait être l'expression d'un phénomène enzymatique simple-, alors que ce n'est pas le cas dans l'air (MOIROUD 1965). On retrouve le même fait avec des cellules de pommes de terre dans certaines conditions. Si on admet implicitement que l'influence du facteur diffusion est supprimée en présence d'oxyde de carbone, la différence de la forme des courbes dans l'air implique que ce facteur ne peut être négligé dans ce cas.

- L'utilisation de mutants ayant une oxydase terminale différente de la cytochrome oxydase n'a pas entrainé les changements attendus en ce qui concerne les valeurs de la concentration critique C_r et des "K_m", mesurés sur les différentes souches de levures utilisées (REYES, NEVILLE, 1963). Ce résultat s'explique mal en termes purement enzymatiques, si on admet que les affinités pour l'oxygène des oxydases ne sont pas identiques (l'un des mutants a une voie d'oxydation différente).

D'autres faits ont nécessité pour être interprétés l'hypothèse d'un transporteur d'oxygène autre que la cytochrome oxydase, ce qui n'est peut-être pas nécessaire si on ne rejette pas à

priori un rôle possible de la diffusion. En particulier :

- Dans les tranches minces de pomme de terre, la concentration critique d'oxygène est très élevée par rapport à celle des mitochondries des mêmes organismes. Il en est de même pour la concentration correspondant à la demi-valeur de la vitesse maximum ($(pO_2)_{50}$). Cette constatation, ainsi que la non linéarité de la représentation en 1/V, 1/C, conduit MAPSON et BURTON (1962) à postuler l'existence de deux enzymes terminaux dans le tubercule de pomme de terre, ayant des K_m très différents (4.10^{-7} M aux faibles tensions d'oxygène, $1,5.10^{-4}$ M pour les tensions élevées).

De même quelques auteurs (LONGMUIR 1970, LONGMUIR et SUN 1971) ont postulé l'existence d'un transporteur d'oxygène, autre que la cytochrome oxydase dans divers tissus animaux, même dépourvus de myoglobine (tranche de foie, de cerveau...).

2- Démarche globale utilisée.

Pour préciser le lien que j'ai établi entre la partie expérimentale et la partie de formalisation dans la résolution du problème posé, j'ai essayé de schématiser la démarche effectuée, et cela indique aussi la forme que prendra cet exposé. Cette démarche se décompose schématiquement en trois étapes.

- La première étape est constituée par la recherche de modèles. Un certain nombre d'hypothèses, que nous voudrions rendre les plus explicites possibles, sont nécessaires à la construction de ces

modèles.
Ce travail d'explicitation de toutes les hypothèses utilisées constitue une phase indispensable -mais souvent sous estimée- car seul il prépare les conditions d'une validation du modèle construit. En quelques cas, j'ai même cherché à expliciter les hypothèses implicites utilisées et il est sans doute téméraire de croire en la certitude d'avoir mis en évidence toutes ces hypothèses.
Les unes sont tirées directement des observations ou des faits expérimentaux, et seront donc les mêmes pour les différents modèles. Elles ont été appelées H_i. Les autres, H_j, choisies en fonction de leur vraisemblance, de ce qu'il est possible d'induire de la réalité accessible... sont également utilisées et leur diversité conduit à différents types de modèles M, M_1, M_3... : $CE \xrightarrow{(+H_j)} M$.

Le schéma (Fig. 1) donne une représentation symbolique des deux domaines où se situent les phénomènes : celui des faits observables de l'expérimentation est nommé "corps expérimental" (C. E.), celui où certains de ces faits peuvent se relier quantitativement entre eux par une expression analytique (M) est nommé : "domaine des relations mathématiques".

Un modèle construit est retenu comme plausible si la relation analytique qui le décrit est vérifiée expérimentalement ; c'est le sens de la flèche: $M \longrightarrow CE$.
Si cette relation ne correspond pas aux résultats expérimentaux, ce qui peut s'exprimer : $M \not\longrightarrow CE$, cela conduit au rejet du modèle, c'est-à-dire aussi au réexamen des hypothèses H_j qui l'ont engendré, et

qui seront alors soit modifiées, soit rejetées.

- Une deuxième étape consiste à utiliser le (ou les) modèle retenu pour prévoir le déroulement des faits dans diverses situations, en appliquant à ce modèle une transformation T qui le change en un modèle M'.

$$M \xrightarrow{T} M'$$

T correspond ici à l'action de l'oxyde de carbone sur la respiration, cet agent étant connu comme inhibiteur compétitif de la respiration au niveau de la cytochrome oxydase.

- La troisième étape résulte de la confrontation du modèle transformé (M') avec les données expérimentales correspondant à la nouvelle situation (par exemple, respiration inhibée par l'oxyde de carbone) :

$$M' \longrightarrow CE$$

Le modèle M de départ peut être conservé si cette relation est vérifiée : il n'y a pas de contradiction entre les prévisions faites à l'aide de ce modèle et les faits expérimentaux.

S'il n'y a pas concordance entre les relations analytiques exprimant M' et les données de l'expérience , le modèle est rejeté, ce qui peut se symboliser par :

$$M' \not\longrightarrow CE$$

Enfin, -et ceci représente une fraction non négligeable de ce travail-, les hypothèses H_j utilisées dans l'édification du modèle sélectionné ont été dans la mesure du possible soigneusement examinées, afin de tester leur validité. Chaque fois que cela nous a semblé réalisable nous avons essayé de les éprouver expérimentalement, soit en leur faisant subir la transformation T comme pour le modèle M, soit en les confrontant à ce qui était accessible de la morphologie du matériel étudié, soit en les confrontant aux autres interprétations possibles. Selon le cas, cette explication des hypothèses a lieu à des étapes diverses du processus.

Cet ensemble de cheminements entre l'expérimentation et l'édification de modèles (dialectique) est schématisé par la figure 1.

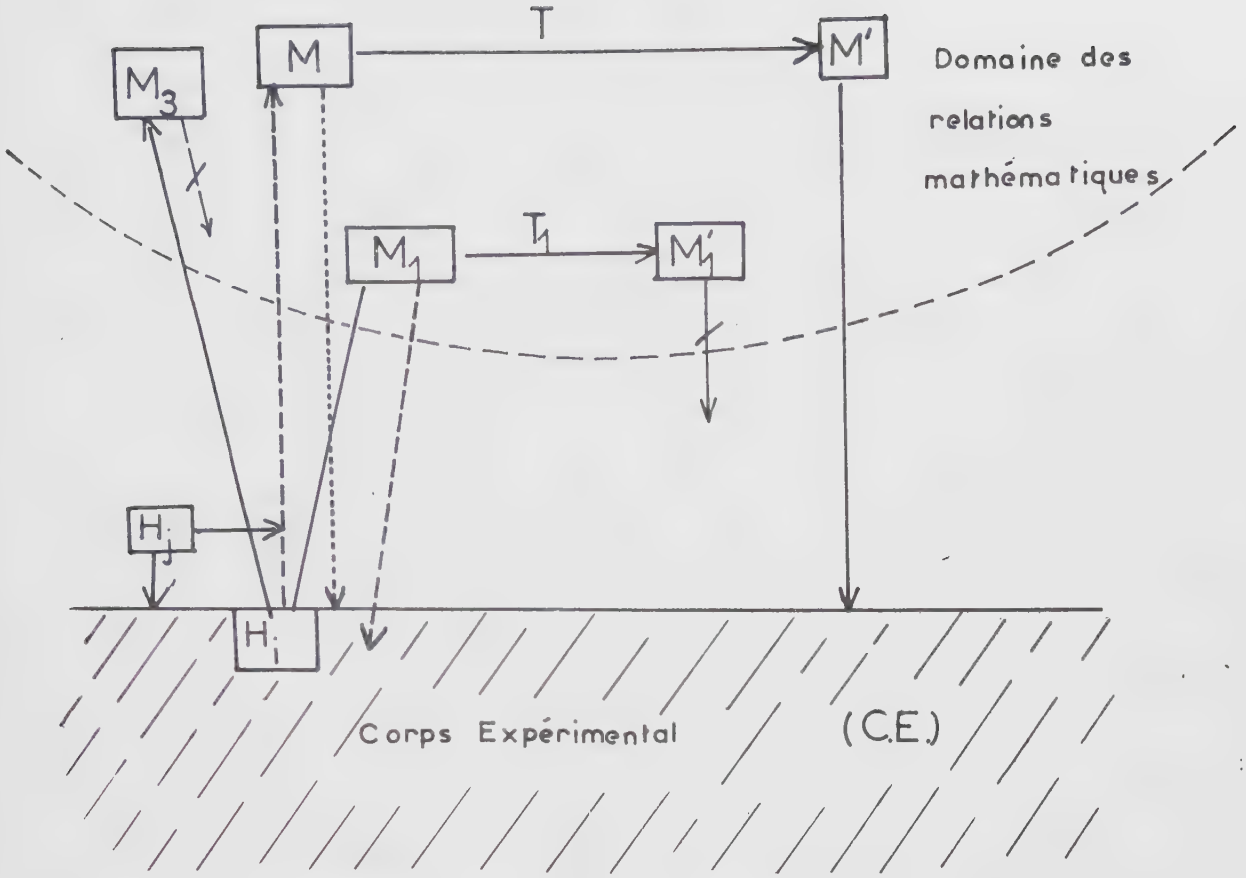


Fig. 1 - Schématisation de la démarche globale utilisée.

H_i Hypothèses tirées des faits expérimentaux connus.

H_j Hypothèses supplémentaires, utilisées également pour la construction d'un modèle M. La flèche $H_j \longrightarrow CE$, indique que ce type d'hypothèses demande si possible une vérification.

$CE \longrightarrow M$ Correspond à la construction d'un (ou plusieurs modèles).

$M \longrightarrow CE$ Correspond à la confrontation du modèle avec les faits expérimentaux. Une flèche barrée indique qu'il n'y a pas identité.

$M \xrightarrow{T} M'$ Indique qu'on fait subir au modèle une transformation T qui le change analytiquement en un modèle M'.

$M' \longrightarrow Ce$ (M' est confronté aux résultats expérimentaux) : le modèle M de départ peut être conservé si cette relation est vérifiée : il n'y a pas contradiction entre les prévisions permises par ce modèle et les faits expérimentaux.

M_1, M_3... Modèles rejetés.

CHAPITRE I

FAITS EXPERIMENTAUX DE DEPART ET HYPOTHESES.

1.1 Données expérimentales initiales.

Pour l'essentiel les expériences ont été réalisées sur des tranches minces de Pomme de terre (variété BINTJE). Les mesures polarographiques de la consommation d'oxygène par ces tissus permettent de connaître les variations :

- de la concentration d'oxygène C en fonction du temps.
- de la vitesse de respiration V (définie comme la dérivée de cette concentration par rapport au temps), en fonction de la concentration en oxygène soit :

(1.11) $C = f(t)$

(1.12) $V = \frac{dC}{dt} = f(C)$

Une particularité de ces tissus observée depuis longtemps, mais dont la cause reste encore inexpliquée, est l'augmentation de la respiration qui se produit au cours du temps chez les disques de Pomme de terre fraîchement coupés.

Ce phénomène a reçu le nom de survie (en anglais "Ageing"). La sensibilité à la tension d'oxygène a été étudiée pendant la période de latence, -qui dure trois à quatre heures après la coupe-, et

pendant l'augmentation de la respiration qui atteint son maximum (2 à 5 fois la vitesse initiale) entre la 16 ème et la 20 ème heure de survie.

Notons qu'un phénomène qui présente des analogies avec celui-ci a été signalé dans les tissus animaux, (LONGMUIR, 1970) bien qu'il soit encore peu étudié.

Afin de tester l'éventualité d'une contamination bactérienne, et les perturbations qui pourraient en résulter sur les mesures de respiration, de nombreux essais ont été faits avec des inhibiteurs de la synthèse des protéines bactériennes. Nous avons comparé le comportement de rondelles respirant dans une fiole où était maintenue une concentration de 50 µg/ml de chloramphénicol, avec celles respirant dans l'eau dans les conditions expérimentales habituelles, et pendant 24 à 48 h. D'autres essais ont été faits à diverses concentrations d'inhibiteurs (15 µg/ml, 10 µg/ml,...). Aucune différence significative dans les mesures de respiration n'a été notée.

Par contre en utilisant de la dihydostreptomycine, nous avons remarqué une nette altération des rondelles désséchées à l'étuve quand elles avaient été traitées avec cet inhibiteur, même pour des concentrations faibles.

La méthode de mesure (système polarographique, système de circulation de mélange gazeux) a été décrite précédemment (CHEVILLOTTE, DUCET, 1969). Elle permet l'obtention de mesures :

- soit dans l'état stationnaire vrai : un équilibre s'établit alors entre la consommation

d'oxygène par l'eau circulante. La vitesse de respiration V (en M $mn^{-1}l^{-1}$) s'écrit alors :

$$V = \frac{v}{A} (Co - C)$$

v = débit d'eau (en l mn^{-1})
Co = Concentration d'oxygène dans l'eau circulante (en Ml^{-1}).
C = Concentration d'oxygène dans la fiole de mesure.

Les unités choisies pour V impliquent que la valeur absolue de la vitesse de respiration en mole/mn/g de poids sec s'obtient en multipliant la valeur nommée (V) par le volume de la fiole de mesure A et en divisant par le poids de tissu étudié.

- Soit dans l'état dit pseudo-stationnaire (l'utilisation de l'oxygène disponible dure d'une à trois heures). Dans ce cas la vitesse de respiration à un instant donné est définie par :

$$V = -dC/dt$$

L'analyse des résultats (également décrite dans l'article cité précédemment) se fait à partir des données numériques, (C = f(t)) recueillies sur bande perforée à l'aide d'un centralisateur de mesure (VIDAR). Un enregistrement graphique permet de contrôler le déroulement de l'expérience.

L'analyse numérique pour l'obtention de la vitesse de respiration, -à chaque instant la dérivée de la courbe décrivant la variation de la concentration en fonction du temps- se fait :

- par des méthodes de lissage de courbe (approximation polynomiale de la courbe C = f(t), puis dérivation du polynôme).

- par des méthodes d'interpolation simples (tangentes à la courbe assimilée à l'arc de cercle pour un petit intervalle) -ou plus complexes (la dérivée première d'une fonction dont on possède un tableau de valeurs peut s'exprimer en fonction des dérivées premières, secondes...).

Les calculs ont été effectués sur ordinateur IBM 1130 au centre de calcul de Saint Jérôme, en langage FORTRAN.

Des mesures relatant la sensibilité de la respiration des tranches minces de tissu à la tension d'oxygène, on peut déduire certaines considérations :

- Observation 1 :

La comparaison du $(pO_2)_{50}$, (concentration mesurée expérimentalement in vivo, quand la vitesse vaut la moitié de sa valeur maximum R_m) avec les valeurs du K_m observées, avec les mitochondries dans l'état 3 de respiration* se traduit par :

(1.13) $$\boxed{(pO_2)_{50} \gg K_m}$$

De même la concentration critique -(c'est-à-dire la concentration à partir de laquelle la respiration commence à diminuer)- des cellules est très élevée par rapport à celle des mitochondries des mêmes organismes.

*Note : L'état 3 de respiration se définit, selon CHANCE par la présence en plus du substrat et des mitochondries, d'ADP en quantité non limitante -état comparable à l'état de respiration in vivo.

- Observation 2 :

Dans les diverses séries d'expériences, quand la vitesse maximum de respiration varie, les autres conditions restant inchangées, il y a proportionnalité entre cette vitesse et le $(pO_2)_{50}$:

(1.14) $$\boxed{(pO_2)_{50} \sim R_m}$$

(CHEVILLOTTE, DUCET, 1969), tableau I.

Moiroud (1963, Pl. IX) trouve un résultat analogue sur des levures.

Avec des cellules de foie, LONGMUIR (1957) observe une relation de régression très proche, entre K_m et $Q(O_2)$:

(1.15) $$K_m = 1{,}2.10^{-9}\ Q(O_2)N + 4{,}26.10^{-8}.$$

(D'après les valeurs de $Q(O_2)N$ rapportées par LONGMUIR, le deuxième terme est très inférieur au premier : dans le rapport de 1 à 10).

- Observation 3 :

En présence d'air, les représentations en (V, V/C) ou (1/V, 1/C) se traduisent par une courbe dont certaines portions seulement sont assimilables à des droites (CHEVILLOTTE, DUCET, 1969, p. 320, Fig.8).

MOIROUD (1963) observe un comportement identique avec des levures.

(1.16) $$\boxed{V \neq a(V/C) + b}$$

Tableau I : Variations de la respiration et du $(pO_2)_{50}$ au cours du temps.

N° des courbes	Temps en heure	QO_2 µl/d'O_2/mg poids sec/h	V_m µM/s/g poids sec x 10^3	$(pO_2)_{50}$ µM/l	$\alpha = \frac{V_m}{(pO_2)_{50}} \times 10^2$
Série N° 1					
I	1	0,15	1,88	5,5	3,4
II	4	0,18	2,24	5,8	3,8
III	7	0,26	3,24	8,7	3,7
IV	10	0,37	4,64	12,8	3,6
V	13	0,51	6,28	17,5	3,6
VI	16	0,53	6,56	21,1	3,1
VII	19	0,52	6,48	19,4	3,3
Série N° 2					
I	1	0,26	3,24	4,14	7,8
II	5	0,30	3,76	5,04	7,4
III	7,30	0,44	5,44	6,94	7,8
IV	10	0,53	6,60	10,33	6,4
V	13	0,63	7,84	11,42	6,9
VI	16	0,64	7,92	11,53	6,9
VII	19	0,58	7,16	18,48	3,7
Série N° 3					
I	1	0,41	5,16	10,1	5,1
II	4	0,49	6,16	12,3	4,7
III	7	0,61	7,10	17,9	4,3
IV	9	0,59	7,40	17,4	4,3
V	12	0,66	8,24	18,5	4,5
VI	14,30	0,67	8,36	20,2	4,1
VII	16,30	0,71	8,80	21,3	4,1

a et b étant des constantes.
Au contraire, ces représentations sont linéaires quand il s'agit de mitochondries ou de cellules fortement inhibées par l'oxyde de carbone.

1.2 Choix des hypothèses.

Quelques hypothèses (de type H_j) choisies pour leur vraisemblance, seront utilisées pour les différents modèles. Dire que ces hypothèses sont "de type H_j" implique, si le modèle auquel elles ont servi de base est retenu, que ces hypothèses seront si possible vérifiées expérimentalement ou explicitées.

1.21 L'hypothèse H_i^1 (formule 1.13), -basée sur une constatation d'ordre expérimental-, suggère la première hypothèse H_j : elle exprime que le K_m de l'oxydase terminale in vivo est indépendant du $(pO_2)^{50}$ observé expérimentalement, et est du même ordre de grandeur que le K_m de la cytochrome oxydase dans les mitochondries.

H_j^1 | K_m in vivo $\equiv$ K_m mitochondrie

1.22 Si l'on considère que le tissu de Pomme de terre (comme les autres tissus de plantes ou certains tissus animaux) est un matériau hétérogène composé de cellules et d'espace inter-cellulaires empli soit d'air, soit d'eau dans certaines conditions expérimentales, alors il semble légitime de considérer que la diffusion de petites molécules comme l'oxygène se fait plus librement dans l'espace inter-cellulaire soit :

H_j^2 $\boxed{De \gg Di}$

De coefficient de diffusion extra-cellulaire
Di coefficient de diffusion intra-cellulaire

1.23 La vitesse d'utilisation de l'oxygène par la cytochrome oxydase "in vivo", peut s'exprimer dans les conditions du régime pseudo-stationnaire, par une relation de type michaélien où V_m représente non pas la vitesse maximum atteinte expérimentalement dans l'air, mais la vitesse qui serait atteinte si l'enzyme était totalement oxydé :

H_j^3 $\boxed{V = V_m\, C/(K_m + C)}$

Cette hypothèse intervient surtout au niveau de l'application de la transformation T.

Les autres hypothèses éventuellement introduites serviront à différencier les modèles envisagés, et porteront plus particulièrement sur la géométrie des cellules et la répartition spatiale des mitochondries.

L'abandon de l'hypothèse H_j^1 entraine le plus souvent la construction de modèles qui postulent soit une oxydase supplémentaire à faible affinité pour l'oxygène, soit un transporteur d'oxygène entre l'oxygène et la mitochondrie (MAPSON et BURTON 1962 ; LONGMUIR 1966).

- L'abandon de l'hypothèse H_j^2 a conduit à batir des modèles de diffusion du type : "diffusion dans une tranche de tissu plane homogène" (WARBURG 1923, LONGMUIR 1970).

- Enfin l'abandon de l'hypothèse H_j^3 a entrainé l'adoption, -pour exprimer la cinétique d'absorption de l'oxygène au niveau mitochondrial- de la formule empirique de BAENDER et KIESE (1957). Les tentatives de modèles construits pour l'expliciter ont été de type purement enzymatique, sans distinction du niveau cellulaire ou mitochondrial (CHANCE 1957, SCHINDLER 1964).

Ces différents cas seront repris et discutés par la suite (chapitre VI).

CHAPITRE II

CONSTRUCTION DE MODELES M

- L'hypothèse H_j^1 : "K_m in vivo $\equiv$ K_m mitochondrie" implique que les modèles construits seront du type "intéraction d'un transport passif (diffusion) avec une réaction enzymatique".

En présence de mélange (O_2 - N_2) ou d'air, cette réaction sera d'ordre zéro, compte tenu de l'observation H_i^1 : $(pO_2)_{50} \gg K_m$.

- Avant d'atteindre l'oxydase terminale, l'oxygène du milieu doit franchir plusieurs phases, principalement : le tissu (diffusion extra-cellulaire) et la cellule (diffusion intra-cellulaire). Si l'on tient compte de l'hypothèse H_J^2 :"De $\gg$ Di", on peut dans les coupes de tissu suffisamment minces, négliger l'influence de la diffusion extra-cellulaire. Il découle de cela que le facteur limitant devient la diffusion dans les cellules, ce qui impose une symétrie sphérique si on considère que la cellule a une forme sensiblement sphérique, ce qui est le cas pour les cellules des tissus utilisés.

Dans le cas de formes quelconques (ellipsoïde, cylindre), il est commode, ainsi que l'a fait HILL (1968,1970) d'introduire la notion de facteur de forme (μ) :

(2.) $\mu = AR/v$

où 2 R est le diamètre de la cellule, v son volume et A l'aire de l'interface avec le fluide extracellulaire. Si l'on s'en tient à la sphère, μ a la valeur 3.

2.1 Premier modèle : sphère homogène.

En un point où la concentration d'oxygène est C, le bilan pour l'oxygène en ce point s'écrit en régime stationnaire ou pseudo-stationnaire :

$$D \nabla^2 C = R_m \qquad (2.11)$$

où ∇^2 est l'opérateur de LAPLACE, D coefficient de diffusion dans la cellule.

Soit pour une sphère :

$$D \left(\frac{d^2C}{dr^2} + \frac{2}{r}\frac{dC}{dr}\right) = R_m \qquad (2.12)$$

Une forme plus irrégulière se traduirait par une équation du type :

$$D \left(\frac{d^2C}{dr^2} + \frac{(\mu - 1)}{r}\frac{dC}{dr}\right) = R_m \qquad (2.13)$$

L'équation (2.12) a été appliquée à l'absorption de l'oxygène par les cellules (GERARD (1931), RASHEVSKY (1960), PENELOUX et DUCET (1963)).

La respiration est maximum quand toute la cellule est alimentée en oxygène.

En dessous d'une concentration critique C_r il y a formation d'une zone d'anaérobiose,

de rayon ρ ($0 < \rho \leqslant R$) :

1° L'analyse des résultats expérimentaux montre que les courbes $V = f(C)$ sont voisines de celles calculées à partir du modèle ci-dessus. (Fig. 7, CHEVILLOTTE, DUCET (1969)).

2° La relation (1.14) tirée de l'observation numéro 2 peut se déduire analytiquement à partir des équations paramétriques du modèle.

En effet si :

$$(2.14) \qquad Co = \frac{R_m R^2}{6 D} (1 - 3 x^2 + 2 x^3)$$

$$(2.15) \qquad V = R_m (1 - x^3)$$

- (x étant égal à ρ/R et Co à la concentration dans le milieu extérieur) - la concentration Co, correspondant à la valeur $R_m/2$ de la respiration, - c'est-à-dire le "K_m expérimental", que nous avons appelé $(pO_2)_{50}$, - s'exprime :

$$(2.16) \qquad (pO_2)_{50} = (Co)_{V=R_m/2} = \frac{AR^2}{D} R_m$$

A étant une constante. De même la concentration critique s'exprime :

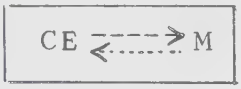
$$(2.17) \qquad C_r = (Co)_{x=o} = \frac{R_m R^2}{6 D}$$

3° La représentation graphique des courbes théoriques simulant les variations de V et de C,

dans les représentations en (1/V, 1/C) montre des parties à grand rayon de courbure assimilables à des droites. (PENELOUX et DUCET (1961), CHEVILLOTTE et DUCET (1969)).

Le fait d'obtenir dans une représentation de ce type deux portions linéaires ne traduit donc pas forcément la présence de deux oxydases terminales, mais peut aussi traduire la limitation par la diffusion d'une respiration régie par un enzyme à très forte affinité pour l'oxygène.

En conclusion, la schématisation des résultats obtenus en confrontant ce modèle aux faits expérimentaux connus serait :

(2.18) 

Cependant un fait semble en contradiction avec ce modèle qui postule que les mitochondries sont, statistiquement du moins, réparties dans toute la cellule : les cellules différenciées de plantes supérieures possèdent une grande vacuole centrale, occupant une partie importante du volume de la cellule (jusqu'à 90 % dans certains cas). (CLOVES et JUNIPER, 1968).

Ces auteurs ajoutent néanmoins que ces vacuoles peuvent être traversées par des travécules de cytoplasme. C'est ainsi qu'on peut voir des photographies obtenues au microscope électronique de cellules de carottes "très vacuolées" avec une large travée de cytoplasme (CLOVES et JUNIPER page 43). Le volume occupé par le protoplasme est alors évalué à 5 % du volume total (cellule et espace inter-cellulaire).

C'est aussi à 5 % du volume de tissu que PITMAN (1963) évalue l'espace occupé par le cytoplasme : cette estimation se fonde d'une part sur une théorie des compartiments (il resterait d'après l'auteur 10 % de mitochondries "dans la vacuole"), et surtout sur des photographies au microscope électronique sur lesquelles le cytoplasme apparait comme une mince pellicule à la périphérie de la cellule. La vacuole occuperait alors 70 % en volume.

L'examen de photographies au microscope optique de protoplastes de feuilles fait apparaître par contre, un rapport du rayon vacuolaire sur le rayon du protoplaste de 0,5 à 0,66. (Communication personnelle de Monique MONTEIL et Michèle LORENZINI).

Ces considérations ont conduit à l'essai d'un deuxième type de modèle.

2.2 Deuxième modèle : Cellule à grande vacuole centrale.

On suppose ici que le cytoplasme est réparti en une mince couche à la périphérie de la cellule de rayon R, le rayon de la vacuole étant désigné par ρ . Les équations correspondantes en régime stationnaire, s'écrivent :

$$(2.21) \qquad \frac{d^2C_1}{dr^2} + \frac{2}{r}\frac{dC_1}{dr} = \frac{Q}{D_1} \qquad \rho < r < R$$

$$(2.22) \qquad \frac{d^2C_2}{dr^2} + \frac{2}{r}\frac{dC_2}{dr} = 0 \qquad 0 < r < \rho$$

Q étant la consommation d'oxygène par unité de volume dans la couche respirante, avec pour conditions aux limites :

(2.23) $r = R \quad C_1 = Co$, concentration du milieu extérieur

(2.24) $r = \rho \quad D_1 \frac{dC_1}{dr} = D_2 \frac{dC_2}{dr}$

(2.25) $r = \rho \quad C_1 (\rho) = C_2 (\rho)$

(2.26) $r = 0 \quad \frac{dC_2}{dr} = 0$ (pas de flux au centre)

Les solutions pour C_1 et C_2 s'écrivent : (Fig. 2).

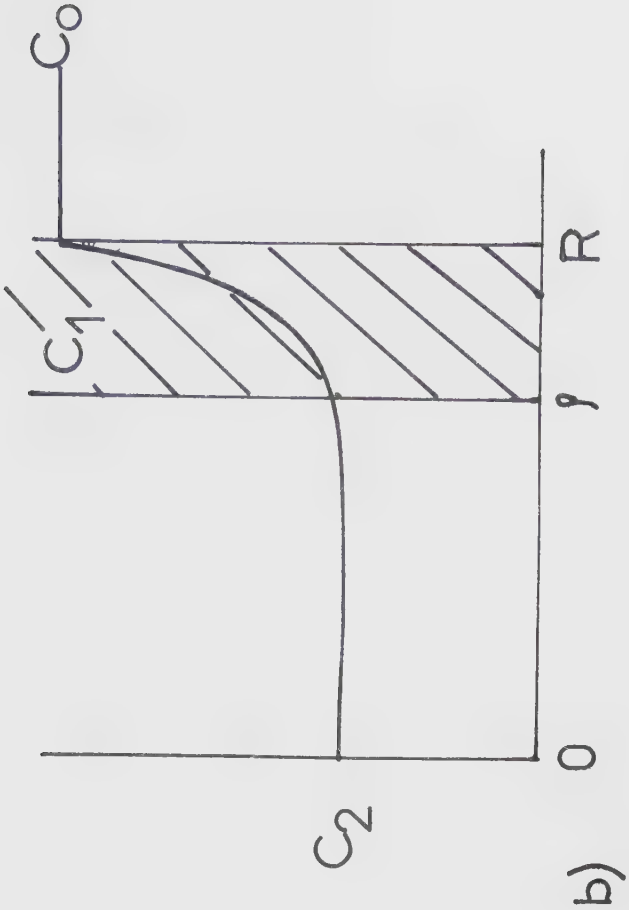
$$(2.27) \quad C_1 = Co - \frac{Q}{6 D_1} \left[(R^2 - r^2) + 2 \rho^3 \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{r} \right) \right]$$

$$(2.28) \quad C_2 = Co - \frac{Q}{6 D_1} \left[\left(R^2 - \frac{2}{\rho}\right) + 2 \rho^3 \left(\frac{1}{R} - \frac{1}{\rho} \right) \right]$$

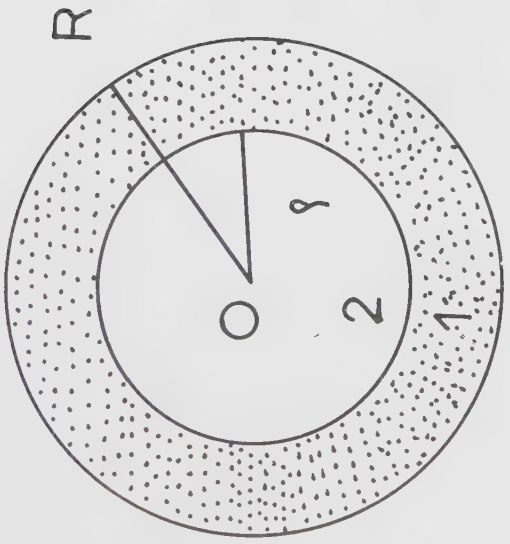
La concentration critique C_r pour ce type de cellule correspond à $C_2 = 0$,

$$(2.29) \quad C_r = A. \frac{QR^2}{6 D_1}$$

A étant une constante fonction de ρ et R. De même que pour la sphère homogène, la concentration critique est proportionnelle à la vitesse de respiration maximum R_m qui s'exprime :



b)



a)

Fig. 2 - Modèle N° 2 à grande vacuole centrale.

a) Schéma d'une cellule avec une couche de cytoplasme périphérique.

b) Répartition du gradient de concentration dans la cellule dans l'état stationnaire pour des concentrations extérieures supérieures à la concentration critique de la cellule.

$$(2.210) \quad R_m = \frac{4}{3} \pi R^3 \left(1 - \frac{\rho^3}{R^3}\right) Q$$

La variation de la vitesse en fonction de la concentration correspond à la variation de la zone d'anaérobiose dont le rayon varie entre ρ et R.

On retrouve les mêmes équations paramétriques que dans le cas de la sphère homogène, (2.14 et 2.15) mais affectées d'un multiplicateur lié au diamètre de la vacuole, et avec :

$$\frac{\rho}{R} < x < 1.$$

La courbe V = f(C) qui s'en déduit (Fig. 3) a une cassure d'autant plus brutale en dessous de la concentration critique que la vacuole est plus grande. Nous ne retrouvons pas dans les résultats expérimentaux sur les tranches minces de Pomme de terre cette décroissance rapide de la vitesse aux environs de la concentration critique qui correspondrait pour ce modèle à une grande vacuole centrale dans la cellule.

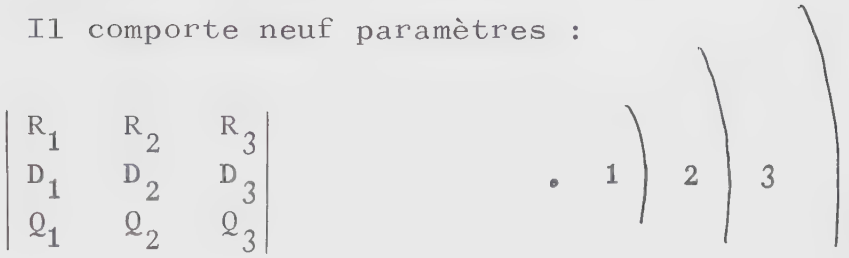
$M_2 \not\longrightarrow CE$

L'étude de modèles un peu plus complexes a ensuite été entreprise, afin de voir si les modèles susceptibles de refléter diverses caractéristiques morphologiques de la cellule et de son environnement, sont également compatibles avec les résultats expérimentaux.

2.3 Modèles à trois zones concentriques.

2.31. Expression analytique du modèle :

Il comporte neuf paramètres :



dont les indices croissent de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Selon les valeurs qui leur sont attribuées, il est possible de tester l'influence d'une membrane externe, de la taille de la vacuole, de la variation des coefficients de diffusion en passant d'une zone à une autre, et éventuellement d'une couche externe de diffusion (espace extracellulaire ou zone de diffusion qui entoure une cellule isolée par exemple).

r, R_i distance au centre d'une cellule

D_i coefficient de diffusion

Q_i coefficient d'absorption par unité de volume d'une couche, en supposant une répartition statistique des mitochondries dans cette zone.

Q est $\geqslant 0$ (par exemple pour une vacuole, une couche de diffusion extérieure à la cellule ou une membrane, on pose $Q = 0$).

C sera la concentration en oxygène.

Le système à résoudre s'écrit, pour le cas stationnaire (régime pseudo-stationnaire de la polarographie ou des expériences de WARBURG) :

$$(2.31)\quad \frac{D_1}{r}\frac{d^2}{dr^2}(C_1 r) = Q_1 \qquad 0 < r \leqslant R_1$$

$$(2.32)\quad \frac{D_2}{r}\frac{d^2}{dr^2}(C_2 r) = Q_2 \qquad R_1 \leqslant r \leqslant R_2$$

$$(2.33)\quad \frac{D_3}{r}\frac{d^2}{dr^2}(C_3 r) = Q_3 \qquad R_2 \leqslant r \leqslant R_3$$

Les solutions sont de la forme :

$$(2.34)\quad C_i = \frac{Q_i}{6 D_i} r^2 + A_i + \frac{B_i}{r} \qquad 1 \leqslant i \leqslant 3$$

Les six constantes A_i et B_i sont déterminées à l'aide des conditions aux limites qui traduisent nos conditions expérimentales :

$$(2.35)\quad C_3 (R_3) = Co$$

Concentration constante du milieu agité.

$$(2.36)\quad D_1 \frac{dC_1}{dr} = D_2 \frac{dC_2}{dr} \Bigg|_{r = R_1}$$

$$(2.37)\quad C_1 (R_1) = C_2 (R_2)$$

$$(2.38)\quad D_2 \frac{dC_2}{dr} = D_3 \frac{dC_3}{dr} \Bigg|_{r = R_2}$$

$$(2.39)\quad C_2 (R_2) = C_3 (R_3)$$

$$(2.310)\quad \frac{dC_i}{dr} \Bigg|_{r = \rho} = 0$$

(2.311) $$C_i(\rho) = 0$$

Le dixième paramètre ρ définit pour un état donné (correspondant à un temps dans nos expériences), le rayon jusqu'où la cellule est alimentée en oxygène : c'est le rayon de la zone d'anaérobiose.

Nous cherchons à exprimer la quantité mesurable dans nos expériences, c'est-à-dire Co, en fonction de ρ , et la vitesse de consommation de l'oxygène, de manière à obtenir des équations paramétriques des variations de V et de C.

- Pour $0 < \rho \leq R_1$

La détermination des constantes conduit à une expression de la concentration :

(2.312)
$$Co_1 = \frac{Q_3}{3\,D_3}\left[\frac{R_3^2}{2} - \frac{3}{2}R_2^2 + \frac{R_2^3}{R_3}\right] +$$

$$\frac{Q_2}{3\,D_2}\left[\frac{R_2^2}{2} - \frac{3}{2}R_1^2 + \frac{R_1^3}{R_2}\right] + \frac{Q_2}{3\,D_3}(R_1^3 - R_2^3)\left(\frac{1}{R_3} - \frac{1}{R_2}\right) +$$

$$\frac{Q_1}{3\,D_1}\left[\frac{R_1^2}{2} - \frac{3}{2}\rho^2 + \frac{\rho^3}{R_1}\right] + \frac{Q_1}{3D_2}\left(R_1^2 - \frac{\rho^3}{R_1} - \frac{R_1^3}{R_2} + \frac{\rho^3}{R_2}\right) +$$

$$\frac{Q_1}{3\,D_3}(\rho^3 - R_1^3)\left(\frac{1}{R_3} - \frac{1}{R_2}\right)$$

et la vitesse s'écrit :

$$(2.313) \qquad V_1 = \frac{4}{3}\pi \left[Q_3 (R_3^3 - R_2^3) + Q_2 (R_2^3 - R_1^3) + Q_1 (R_1^3 - \rho^3) \right]$$

La concentration critique est donnée en remplaçant ρ par zéro dans l'équation (2.312) (cellule juste alimentée au centre). S'il existe une vacuole centrale, cela se traduit par $Q_1 = 0$, et cela revient au même de faire $\rho = R_1$ pour le calcul de la concentration critique C_r.

La vitesse maximum de respiration a pour expression :

$$(2.314) \qquad R_m = \frac{4}{3}\pi \left[Q_3 (R_3^3 - R_2^3) + Q_2 R_2^3 - R_1^3) + Q_1 R_1^3 \right]$$

- Pour $R_1 \leqslant \rho \leqslant R_2$:

$$(2.315) \qquad Co_2 = \frac{Q_3 R_3^2}{6 D_3} \left[1 - 3\frac{R_2^2}{R_3^2} + 2\frac{R_2^3}{R_3^2} \right] + \frac{Q_2}{3 D_2} \left[\frac{R_2^2}{2} - \frac{3}{2}\rho^2 + \frac{\rho^3}{R_2} \right] + \frac{Q_2 R_2^2}{3 D_3} (1 - \frac{\rho^3}{R_2^3}) (1 - \frac{R_2}{R_3})$$

on retrouve là une formule analogue à celle de GERARD (1931) pour son modèle à deux couches concentriques. Pour la vitesse :

$$(2.316) \qquad V_2 = \frac{4}{3}\,\pi \left[Q_3(R_3^3 - R_2^3) + Q_2\,(R_2^3 - \rho^3) \right]$$

Enfin quand la zone d'anaérobiose atteint la troisième zone, la concentration s'écrit :

- Pour $R_2 \leqslant \rho \leqslant R_3$

$$(2.317) \qquad Co_3 = \frac{Q_3 R_3^2}{6\,D_3}\left(1 - \frac{3\,\rho^2}{R_3^2} + 2\frac{\rho^3}{R_3^3}\right)$$

et la vitesse :

$$(2.318) \qquad V_3 = \frac{4}{3}\,\pi\,Q_3(R_3^3 - \rho^3)$$

Remarque : Si on prend comme cas particulier $R_1 = R_2 = R_3 = R$ et $D_1 = D_2 = D_3 = D$, on retrouve bien (à partir de 2.312) pour expression de la concentration critique (correspondant à $\rho = 0$), la formule de la sphère homogène :

$$Co = \frac{QR^2}{6\,D}$$

2.32. Exploitation numérique :

Un programme de calcul numérique permet d'obtenir la variation de la vitesse en fonction de la concentration quand le paramètre ρ varie. Ce programme a été écrit en langage FORTRAN et exploité sur ordinateur IBM 1130, équipé d'un traceur de courbes. Il utilise les paramètres de normalisation :

Tableau II : Valeurs des paramètres correspondant aux courbes des figures 4 à 7.

courbe	$RA1 = \frac{R_1}{R_3}$	$RA2 = \frac{R_2}{R_3}$	$AB1 = \frac{Q_1}{Q_2}$	$AB3 = \frac{Q_3}{Q_2}$	$DIF1 = \frac{D_2}{D_1}$	$DIF3 = \frac{D_2}{D_3}$
EX 1.3	0.85	0.999	0.001	0.	0.1	10.
EX 2.4	0.85	0.999	0.01	0.1	0.1	10.
EX 3.1	0.85	0.990	0.01	0.1	0.1	10.
EX 3.32	0.75	0.999	0.1	1.	1.	1.
EX 3.23	0.65	0.999	0.1	0.	0.001	1.
EX 3.22	0.75	0.999	0.1	0.	0.001	1.
EX 3.02	0.75	0.999	0.01	0.	0.001	1.
EX 4.00	0.75	0.999	0.1	1.	0.001	1.
EX 3.12	0.75	0.999	0.01	0.	0.001	10.
EX 2.1	0.67	0.67	1.	5.	1.	1.
E 2.1	0.67	0.67	1.	5.	1.	1.
E 2.0	1.	1.	1.	1.	1.	1.

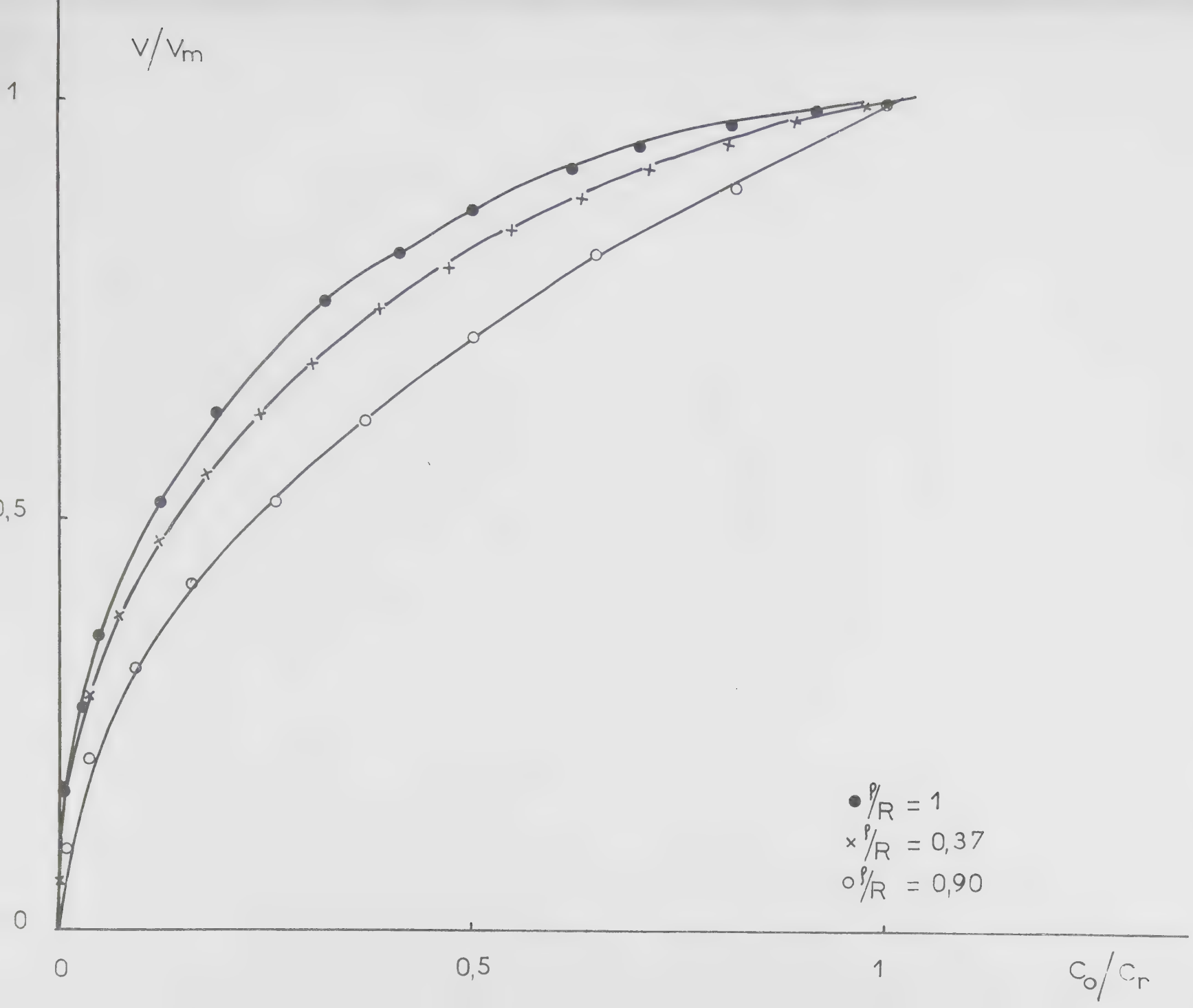
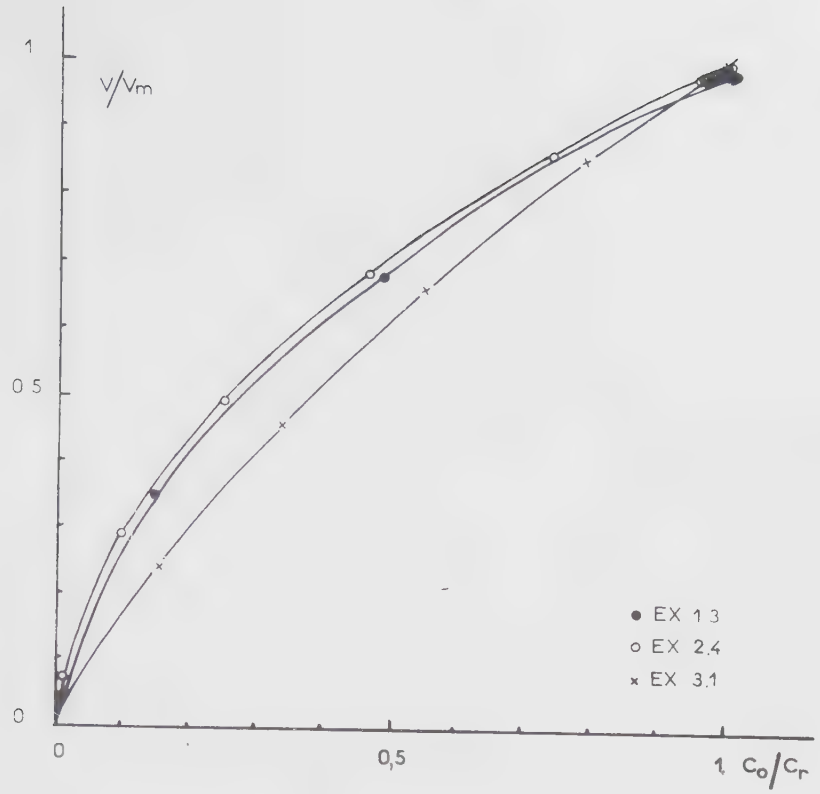

V/Vm
1
0,5
0
0
0,5
1
Co/Cr
● ρ/R = 1
× ρ/R = 0,37
○ ρ/R = 0,90

Fig. 3 - Deuxième modèle de cellule sphérique : Influence d'une vacuole centrale.

1 •—— • sphère homogène

2 x—— x cellule avec une petite vacuole occupant 5 % du volume.

3 o—— o cellule avec une grande vacuole occupant 70 % du volume.



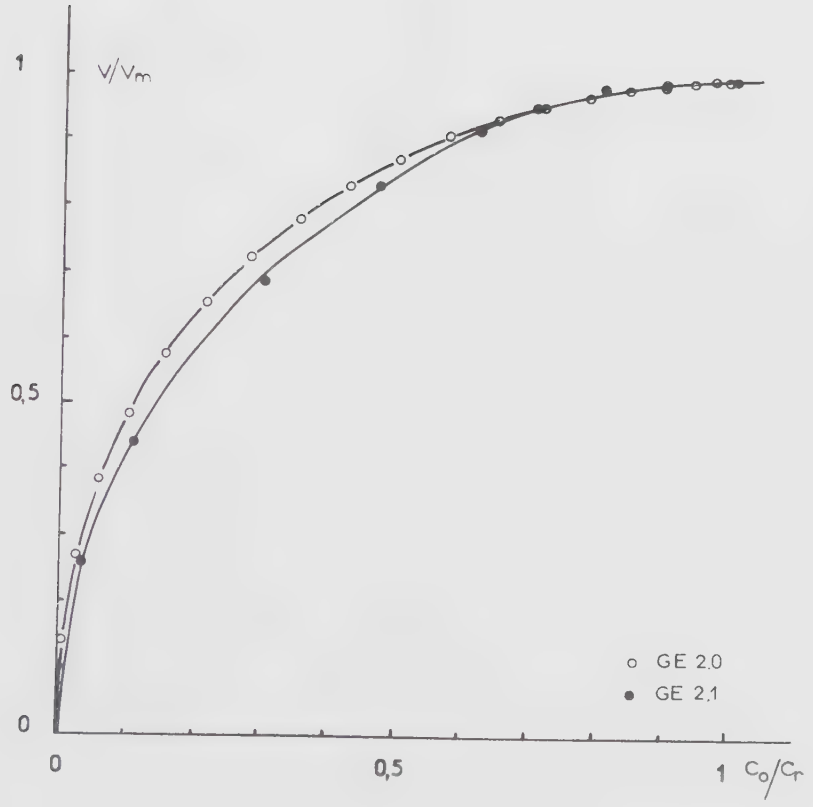
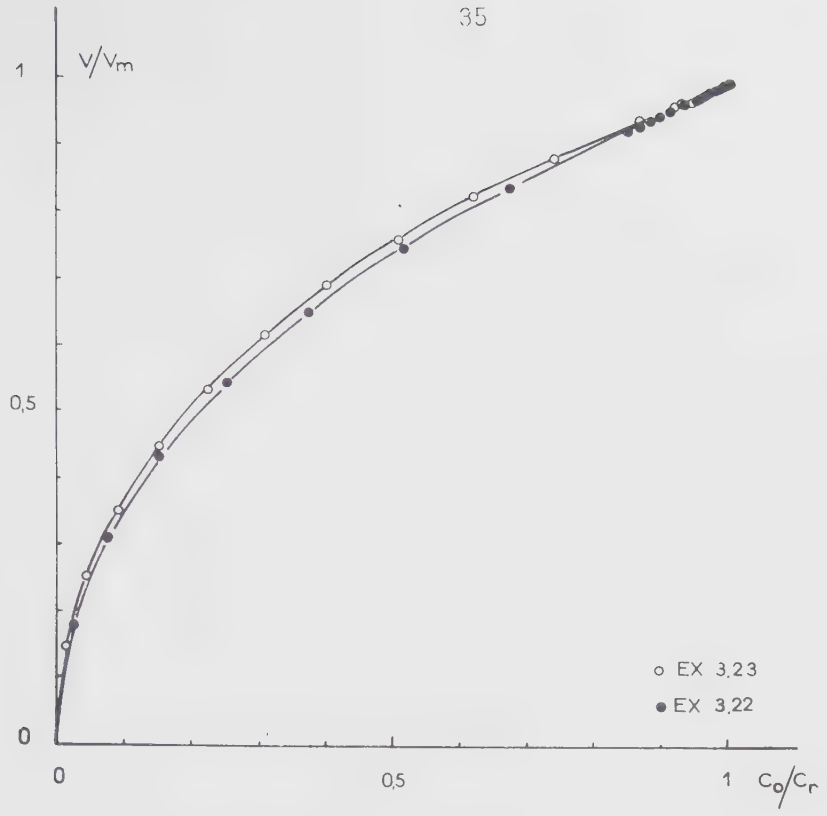


Fig. 4 et 5 - Variations de la vitesse de respiration d'une cellule en fonction de la concentration en oxygène. Modèle à trois couches concentriques dont les paramètres sont indiqués dans le tableau II.



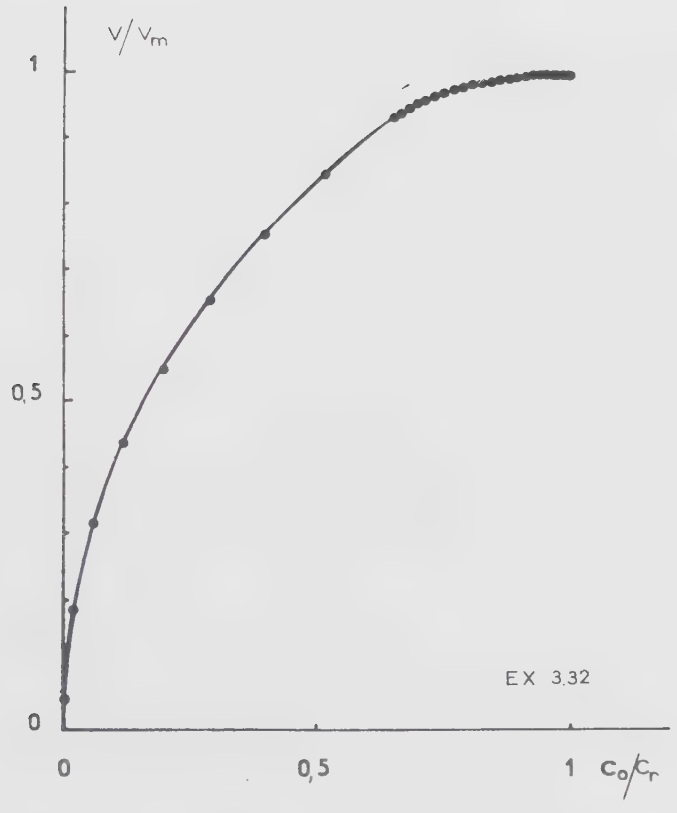


Fig. 6 et 7 - Variation de la vitesse de respiration d'une cellule en fonction de la concentration en oxygène. (valeur des paramètres indiqués dans le tableau II).

$AB_1 = Q_1/Q_2$ $\quad RA_1 = R_1/R_3$ $\quad Dif\ 1 = D_2/D_1$
$AB_3 = Q_3/Q_2$ $\quad RA_2 = R_2/R_3$ $\quad Dif\ 3 = D_2/D_3$
$X_1 = \rho/R_3$ $\quad X_1$ varie de 0 à 1.

Les figures 4 à 7 représentent les variations de la vitesse de respiration d'une cellule en fonction de la concentration en oxygène dans un milieu extérieur agité, pour divers paramètres morphologiques. Les valeurs des paramètres sont données dans le tableau II.

GE 2.0 correspond à la courbe de diffusion pour la sphère homogène.

GE 2.1 : on retrouve ici un cas cité par GERARD (1931, p 256).

EX 4.00, EX 3.22 et EX 3.02 sont superposables ; le paramètre ayant la plus grande influence est ici DIF 1 : la différence des coefficients de diffusion D_1 et D_2 est telle que la quantité de mitochondries dans la zone centrale joue peu, de même que l'existence d'une membrane si son coefficient de diffusion est du même ordre de grandeur que celui du cytoplasme.

EX 3.12 a sensiblement les mêmes caractéristiques, avec pour différence, un coefficient de diffusion membranaire 10 fois plus petit : la courbe est légèrement au-dessous des précédentes, l'écart étant un peu plus grand quand la concentration diminue.

EX 3.23 a des caractéristiques comparables à EX 3.22 sauf en ce qui concerne la vacuole qui est plus grande : elle se place cependant légèrement au dessus de EX 3.23.

EX 3.32 et GE 2.1 sont peu applaties pour des grandes valeurs de la concentration, et sont

proches d'une courbe de diffusion sphérique dans une cellule homogène : elles sont caractérisées par l'absence d'une membrane influente.

EX 1.3, EX 2.4 et EX 3.1 ont en commun une membrane externe dont le coefficient de diffusion est 10 fois plus petit que celui du cytoplasme. Alors que pour EX 1.3, il n'y a pratiquement pas de travécules de cytoplasme dans la vacuole (1 % de mitochondries seulement), EX 2.4 renferme 10 % des mitochondries dans la partie centrale et se trouve de ce fait un peu au-dessus de EX 1.3. Par contre, le fait que la couche extérieure de diffusion (avec $D_3 = 10\ D_2$) soit égale à 1/100 du rayon total pour EX 3.1, (alors qu'elle est de 1/1000 pour EX 2.4) entraîne que cette courbe est extrêmement aplatie : l'épaisseur relative de la membrane semble jouer un rôle important quand le coefficient de diffusion de celle-ci est inférieur à celui de la couche interne. Pour une cellule comme celle de la Pomme de terre dont le rayon moyen est 60 μ et l'épaisseur de la membrane de 80 à 100 Å, le rapport serait de l'ordre de 2.10^{-4}.

Remarque : Nous n'avons pas utilisé pour exprimer le flux φ_M à travers une membrane le formalisme classique :

$$\varphi_M = K(C_2 - C_1)$$

où K représente un coefficient de perméabilité pour une membrane supposée infiniment mince ce qui peut aussi s'écrire :

$$\varphi_M = -Kdr \frac{C_2 - C_1}{dr} = D \frac{dC}{dr} \Bigg|_{r = R}$$

En effet, si la dimension du volume est de l'ordre de trois fois le libre parcours moyen de la substance diffusante (parcours défini comme le rapport entre la vitesse moyenne d'une particule et le nombre moyen de chocs qu'elle subit pendant un temps Δt), on peut appliquer l'approximation de la diffusion. Une formule approchée issue d'une étude au niveau microscopique du problème exprime le libre parcours moyen λ d'une particule B diffusant dans un milieu A.

$$\lambda = \frac{m_A}{\sqrt{2}\ \pi\ d_A\ (r_A + r_B)^2}$$

m_A = masse
d_A = densité
r_A, r_B rayon des molécules A et B.

Pour l'oxygène diffusant dans l'eau on évalue :

$$3\ \lambda = 1,3.10^{-8}\ \text{cm} = 1.3\ \mathring{A}$$

L'épaisseur des membranes biologiques étant de l'ordre de 80 $\mathring{A}$, il semble que l'utilisation des équations statistiques de la diffusion soient justifiées.

Le modèle qui serait celui d'une cellule comprenant une grande vacuole et une mince couche de cytoplasme ($Q_1 = 0$, $Q_3 = 0$ (membrane) $D_3 < D_2 < D_1$) n'est pas compatible avec les résultats expérimentaux.

Il en est de même pour ceux qui postulent une membrane exerçant une grande barrière de diffusion.

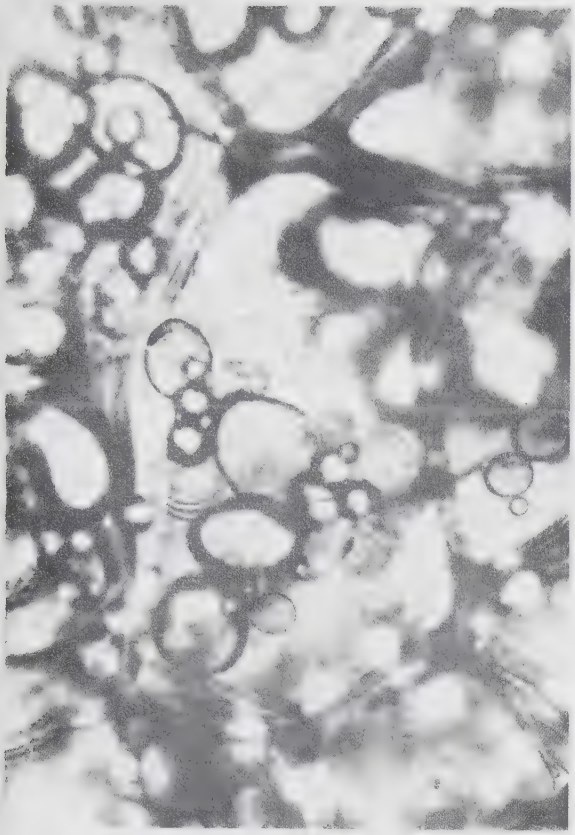
Dans le cas d'un modèle qui comprendrait deux couches intérieures (vacuole et cytoplasme) et une couche limite de diffusion dans un milieu agité), l'influence de cette dernière est négligeable si $D_2 \ll D_3$.

On peut rapprocher le résultat concernant l'influence de la membrane interne des travaux de FENICHEL et HOROWITZ (1963) concernant la cinétique du transport de corps non électrolytiques dans le muscle. L'étude est faite en régime dynamique et il n'y a pas utilisation de ces corps comme dans le cas de l'oxygène. La comparaison avec les résultats expérimentaux plaide en faveur d'un processus de diffusion cytoplasmique, sans qu'un processus de perméation membranaire ou de surface soit mis en évidence.

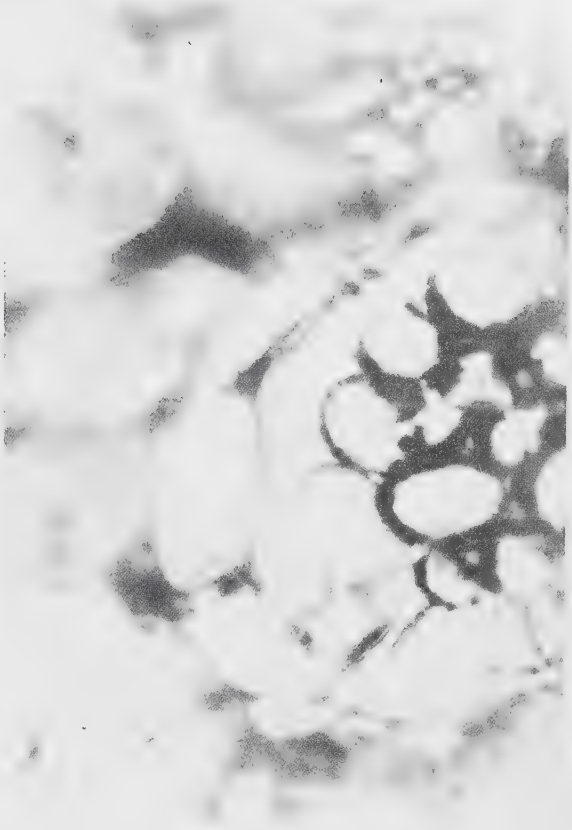
2.4 Observations au microscope optique et conclusion.

En collaboration avec F. MARTY, (laboratoire de CYTOLOGIE VEGETALE), nous avons d'abord essayé d'observer au microscope électronique une cellule entière de Pomme de terre. Mais il n'a pas été possible, d'obtenir une fixation, si rapide fut-elle, qui ne détruise pas la structure de la cellule (l'amidon étant chassé au-dehors). En microscopie photonique les divers essais de coloration de la vacuole pour l'observation in vivo se montrèrent également infructueux. Par contre, l'observation vitale directe a révélé la présence de nombreuses travécules cytoplasmiques dans toute la cellule, lentement déformables au cours du temps, ainsi que des regroupements fréquents des grains d'amidon (dans le cytoplasme) au centre de la cellule. Ceci

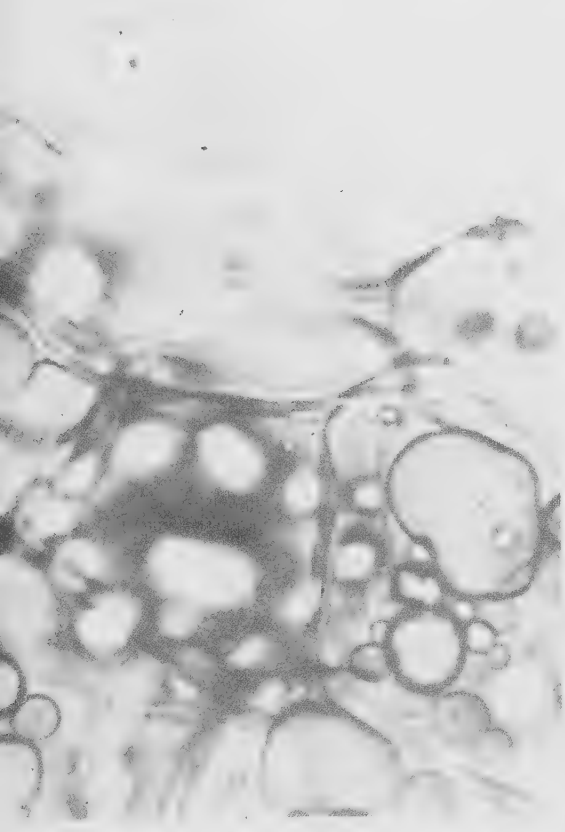
s'accorde mieux avec une répartition statistiquement sphérique des mitochondries qu'avec une répartition uniquement périphérique. (planches)



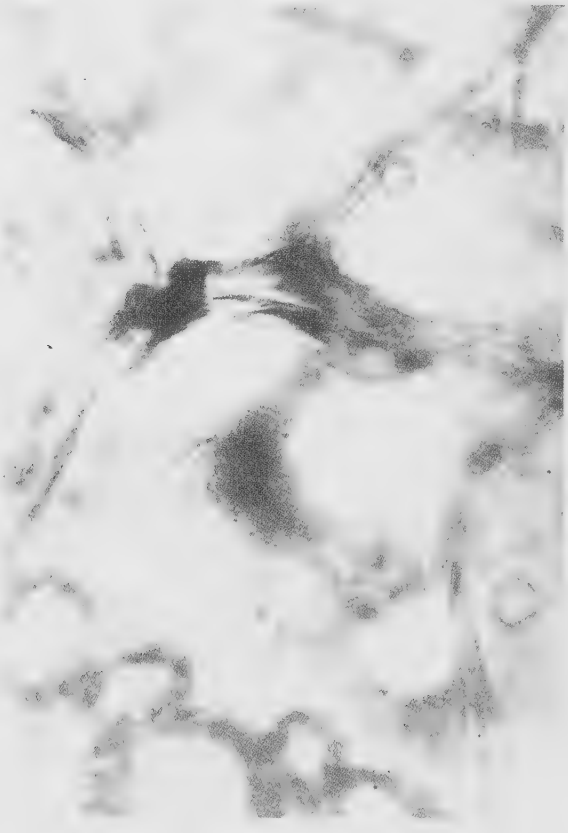
1



2



3



4

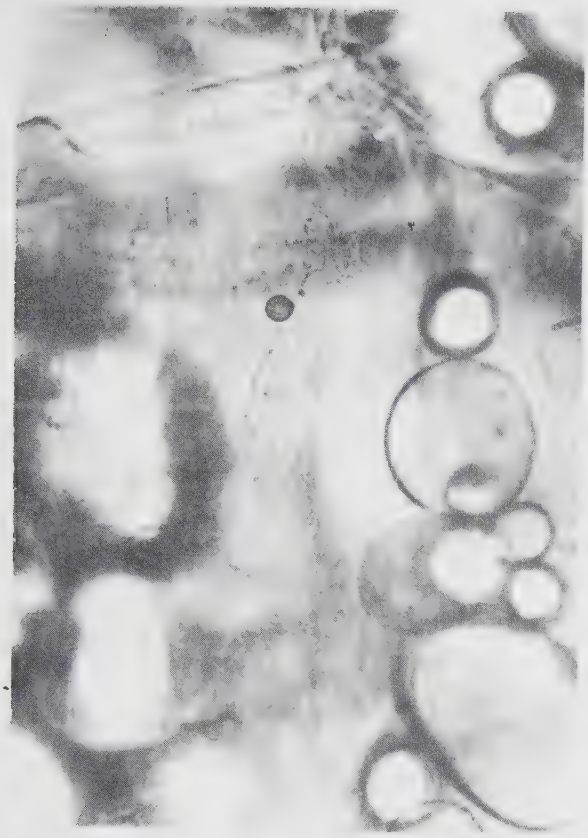
Planche I -

1 - On voit nettement l'amidon au centre de la cellule, avec le cytoplasme occupant ici la majeure partie de la cellule (grossissement : x 105)

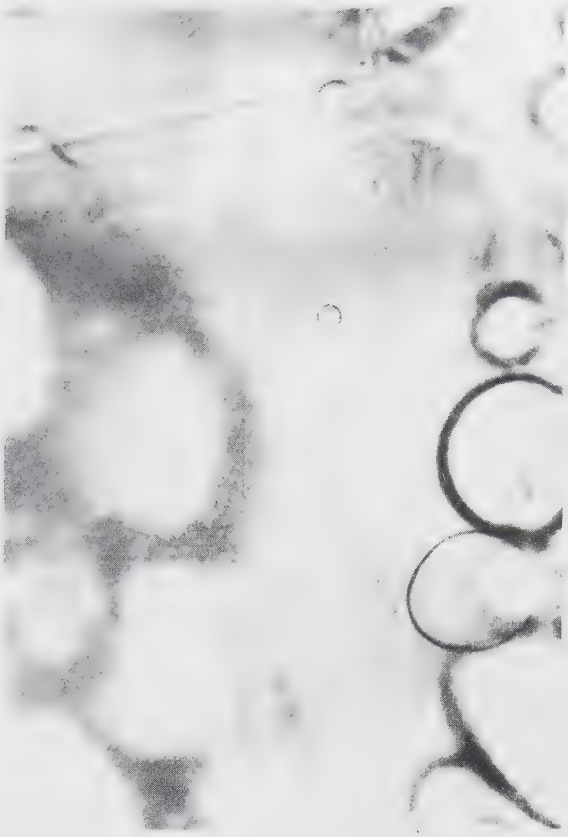
2 - Travées apparentes entre le centre et la périphérie (x 105)

3 - Grossissement : x 105

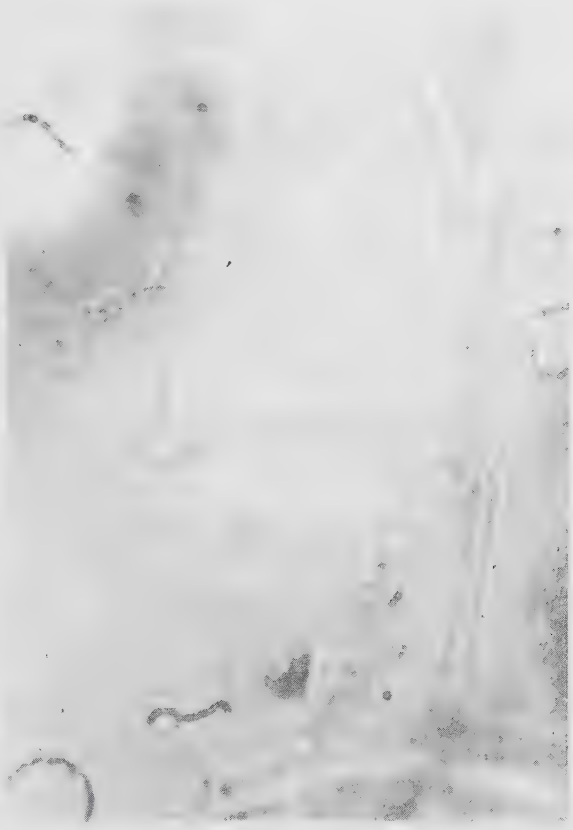
4 - Observation de petites vacuoles périphériques (x 180).



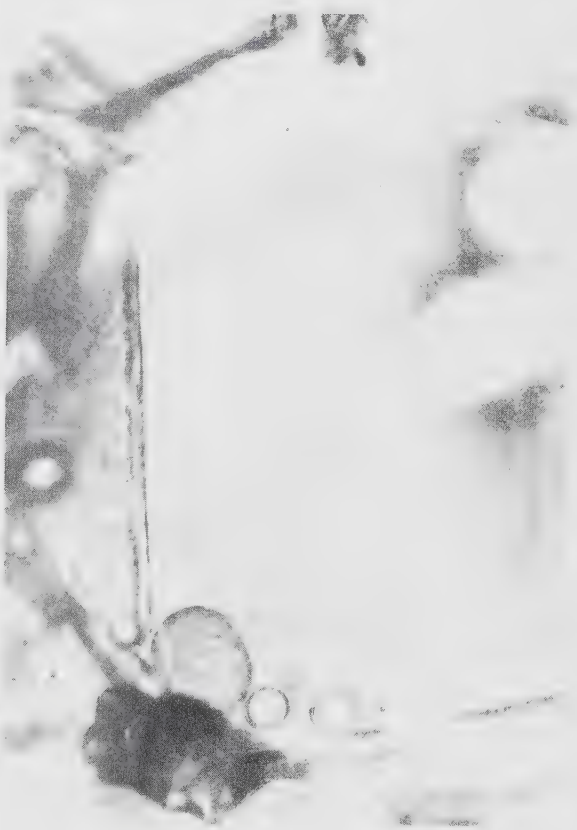
5



6



7



8

Planche II - 5 et 6 - Même portion de cellule photographiée à quelques minutes d'intervalle (x 180). Le cytoplasme se déforme lentement.

7 - Fragment de cellule (x 420)

8 - Cellule ayant séjourné une nuit dans une solution de rouge neutre (x 180).

CHAPITRE III

ACTION DE L'OXYDE DE CARBONE : UTILISATION DU MODELE RETENU POUR PREVOIR LE COMPORTEMENT DANS LA TRANSFORMATION T

$$M \xrightarrow{T} M'$$

La transformation T choisie ici correspond à l'action de l'oxyde de carbone. Celui-ci est un inhibiteur compétitif de la réaction cytochrome oxydase-oxygène.

3.1 Au niveau mitochondrial.

Le modèle M explique la décroissance de la respiration dans l'air aux faibles concentrations d'oxygène par la diffusion de l'oxygène à travers la cellule. Pour prévoir à l'aide de ce modèle sphérique de diffusion intra-cellulaire le mécanisme de la respiration inhibée, en présence d'oxyde de carbone, il faut d'abord décrire le comportement du système au niveau mitochondrial.

En vertu de l'hypothèse H_j^3 citée précédemment, la vitesse d'utilisation de l'oxygène au niveau de l'oxydase s'exprime par une relation de type michaélien :

$$V = V_m C/(K_m + C) \qquad (3.1)$$

qui devient en présence d'un inhibiteur compétitif (I) :

$$V = V_m C/(K_{m\ ap.} + C) \qquad (3.2.)$$

avec :

$$K_{m\ ap.} = K_m(1 + \frac{I}{K_i}) \qquad (3.3.)$$

V_m étant toujours une vitesse maximum théoriquement accessible si l'enzyme terminal est totalement oxydé.

3.2. Au niveau des cellules "in vivo".

La respiration de disques minces de Pomme de terre fraîchement coupés est inhibée par l'oxyde de carbone. Cette inhibition décroit ensuite au cours du temps.

Dans nos expériences sur des tranches minces de Pomme de terre, l'oxyde de carbone est présent en concentration constante et en excès. La seule réaction limitée par la diffusion dans le cytoplasme est donc celle qui a lieu entre l'oxydase terminale et l'oxygène. Un témoin permet d'observer le comportement dans l'air (courbe ∝ des fig. 10 et 11).

La limitation de la vitesse de respiration par la diffusion dans l'air correspond à la formation d'une zone d'anaérobiose au centre de la cellule, quand la concentration en oxygène devient critique. (Fig. 8).

Cette concentration critique est reliée à la vitesse par :

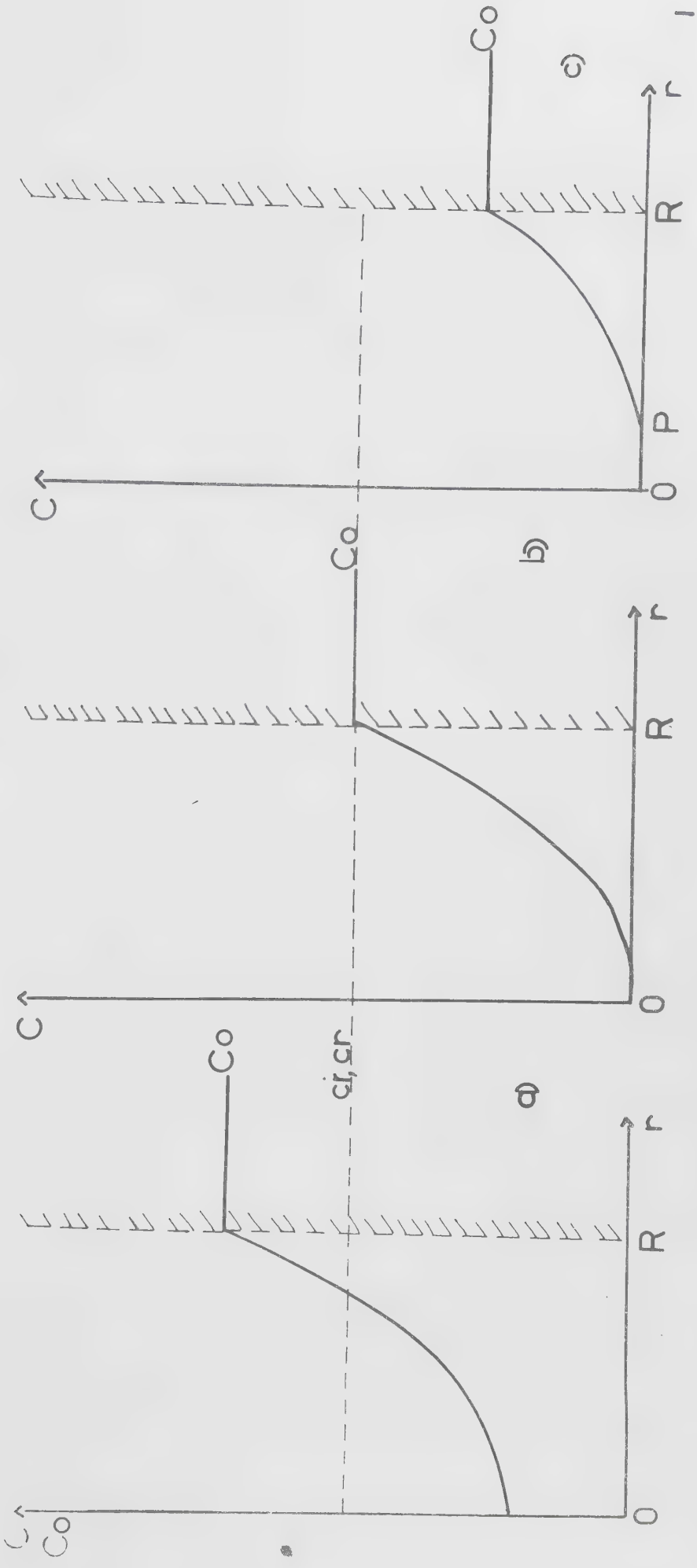

c)
Co
r
R
P
O
C
b)
Co
r
R
O
C
a)
Ci, Cr
Co
r
R
O
C
Co

Fig. 8 - Gradient de concentration à l'intérieur d'une cellule, dans le cas d'un régime stationnaire.

a) Co, concentration à l'extérieur de la cellule, est supérieure à la concentration critique : il n'y a pas de zone d'anaérobiose dans la cellule.

b) Co = Cr en présence d'air, ou Co = Ci en présence d'oxyde de carbone, limite de la zone de diffusion réaction.

c) Co est inférieure à la concentration critique : il y a formation d'une zone d'anaérobiose à l'intérieur de la cellule ($0 < r < \rho$).

(3.4) $$C_k = V_k \frac{R^2}{6\ D}$$ (identique à la relation 2.17)

k = r dans les mélanges N_2-O_2
k = i " " " CO-O_2

Dans l'oxyde de carbone comme dans l'air, la concentration critique peut se définir graphiquement comme l'intersection entre une droite de pente $R^2/6\ D$, et la courbe exprimant la variation de la vitesse en fonction de la concentration.

Dans les mélanges (O_2, N_2), la réaction est d'ordre zéro dans le domaine de concentrations envisagé, et à C_r correspond la vitesse maximum expérimentale R_m.

$$V_r = R_m \text{ pour } C \geqslant C_r$$

Dans les mélanges (CO, O_2) la réaction est du premier ordre, et à C_i correspond une vitesse V_i :

(3.5) $$V_i = \frac{V_m C_i}{K_m(1 + \frac{I}{K_i}) + C_i}$$

qui est une relation hyperbolique, valable pour

$$C \gg C_i$$

La forme de la courbe traduisant cette relation hyperbolique $V = V_m C/(K_{m\ ap} + C)$ (identique à la relation (1.12)), dépend de la valeur de (I).

Si (I) est faible, l'inhibition est moyenne et il y a intersection entre la courbe (3.2) et la droite de pente $R^2/6\ D$, donc existence d'une zone de

diffusion réaction (pour $C \leq C_i$).

Graphiquement cette zone est représentée par l'espace compris entre l'axe des vitesses et la droite de pente $R^2/6\ D$, déduite de la relation (3.4).

En dehors de ce domaine, la vitesse de respiration en présence d'oxyde de carbone s'exprime par la relation (3.2) et les représentations en (V, V/C) sont linéaires : c'est le cas de la courbe β de la figure. 10 et de la portion AB de la courbe γ de la fig. 11.

A l'intérieur du domaine, l'intéraction de la diffusion et de la réaction enzymatique s'exprime dans le cas d'un régime quasi-stationnaire (BLUM et JENDEN (1957), RASHEVSKY (1960)).

$$(3.6) \qquad \nabla^2 (C) = \frac{1}{D} \frac{V_m\ C}{K_{m\ ap} + C}$$

Compte tenu de l'équation (3.2) qui exprime la variation de la vitesse au niveau de l'enzyme et en présence d'inhibiteur, il revient au même de dire que la transformation T change l'équation 2.11 en 3.6.

Dans le cas d'une sphère, la vitesse moyenne de respiration qui s'en déduit peut s'écrire (DUCET (1961)) :

$$(3.7) \qquad V = V_m \left(1 - \frac{\beta}{a_o}\right) \left[1 - \frac{\alpha \beta}{10\ a_o^2} + \frac{\alpha^2 \beta}{840\ a_o^4} (10 a_o - 13 \beta) - \ldots\right]$$

avec

$$(3.8.) \qquad \beta = \frac{K_{m\ ap}}{Co} \qquad \alpha = \frac{R^2\ V_m}{D} \frac{1}{Co}$$

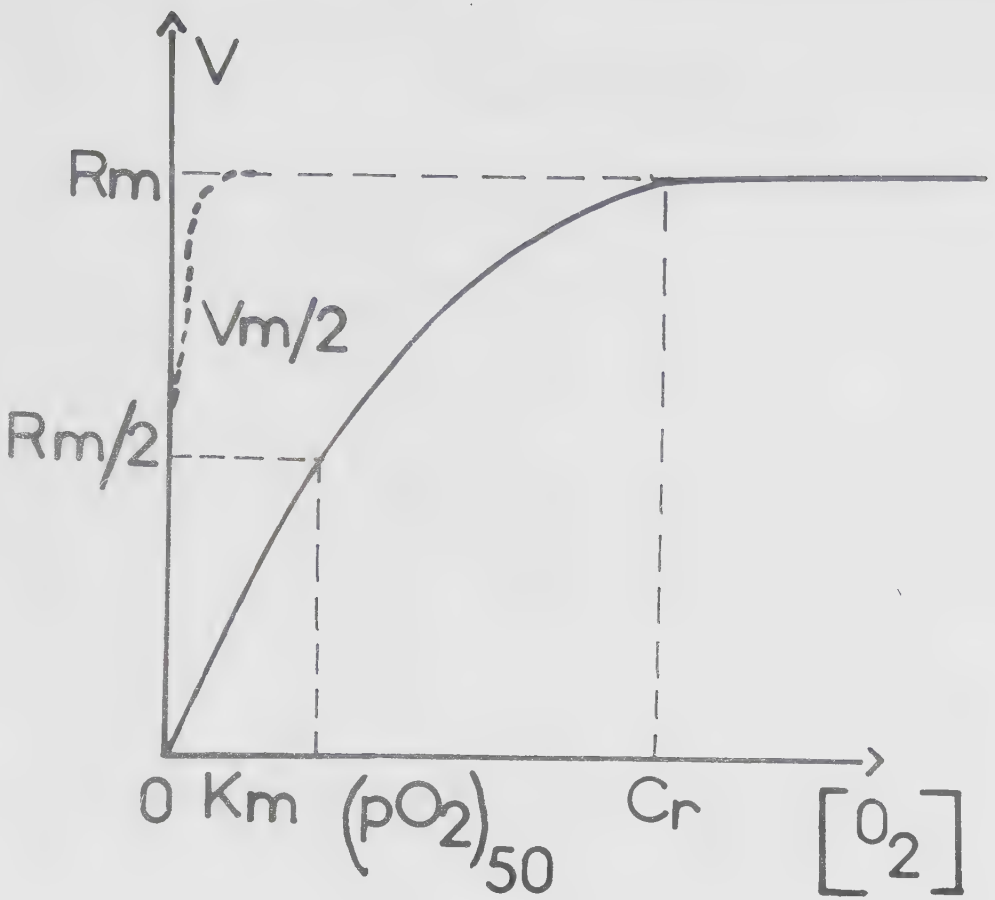
a_o est une constante d'intégration (par rapport à C). A partir de l'équation (3.7), nous avons déterminé les valeurs de a_o, sachant que si D est très grand, la diffusion n'intervient plus et par conséquent :

$$V = \frac{V_m C_o}{K_m + Co} = V_m \left(1 - \frac{K_m}{a_o C_o}\right) \qquad (3.9.)$$

ce qui conduit à :

$$a_o = (1 + \beta)$$

Graphiquement, le changement de cinétique dans la zone de diffusion-réaction devrait se traduire par un écartement de la droite de pente "$K_{m\ ap}$" dans la représentation en (V, V/C) (Fig. 11 portion oA de la courbe γ).


V
Rm
Vm/2
Rm/2
0 Km
$(pO_2)_{50}$
Cr
$[O_2]$

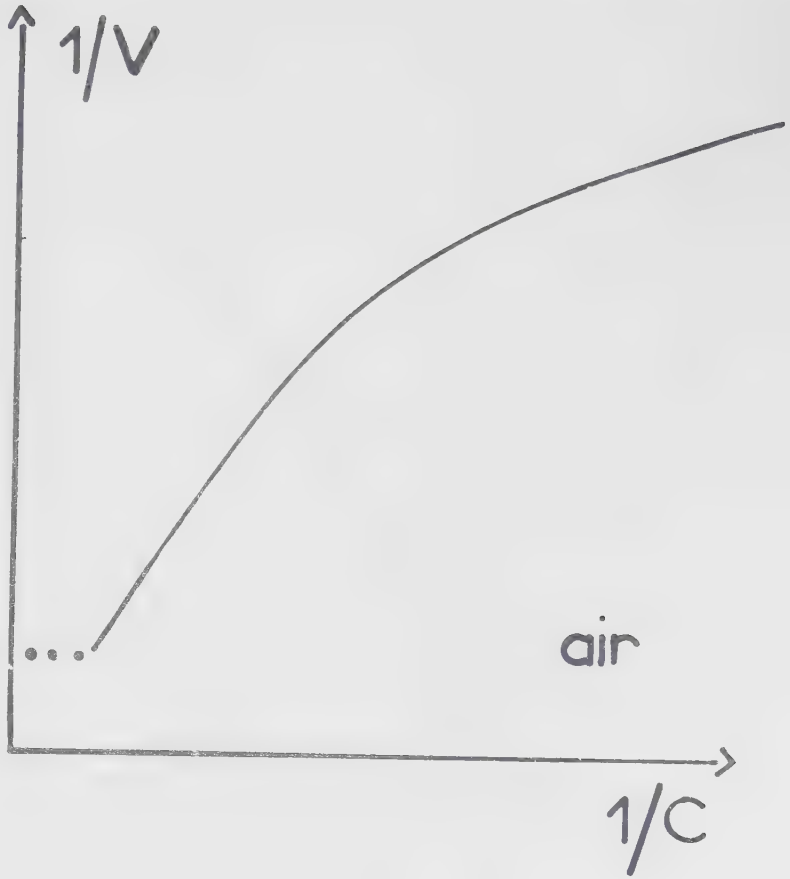
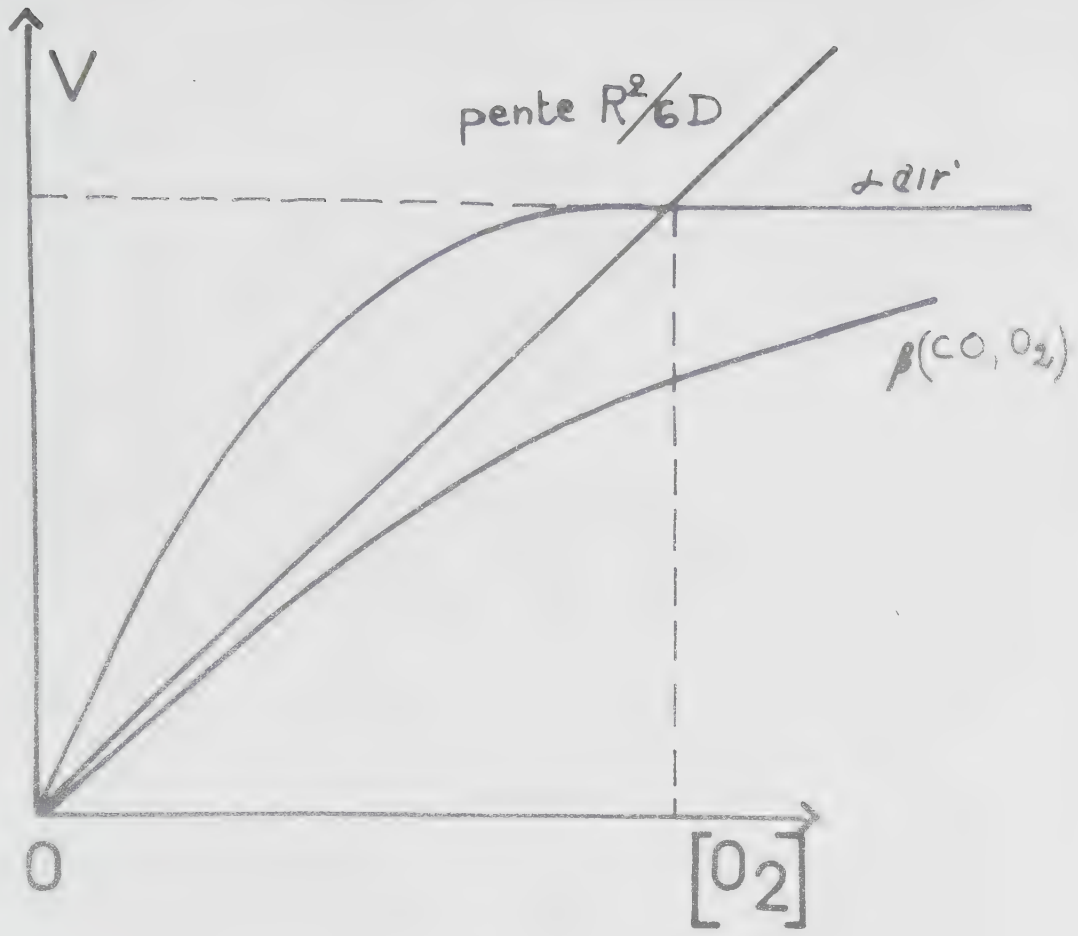

1/V
air
1/C

Fig. 9- Respiration dans l'air : tranches minces de Pomme de terre $(pO_2)_{50} \gg K_m$ mesuré dans les mitochondries.


V
pente $R^2/6D$
α air
$\beta(CO, O_2)$
0
$[O_2]$

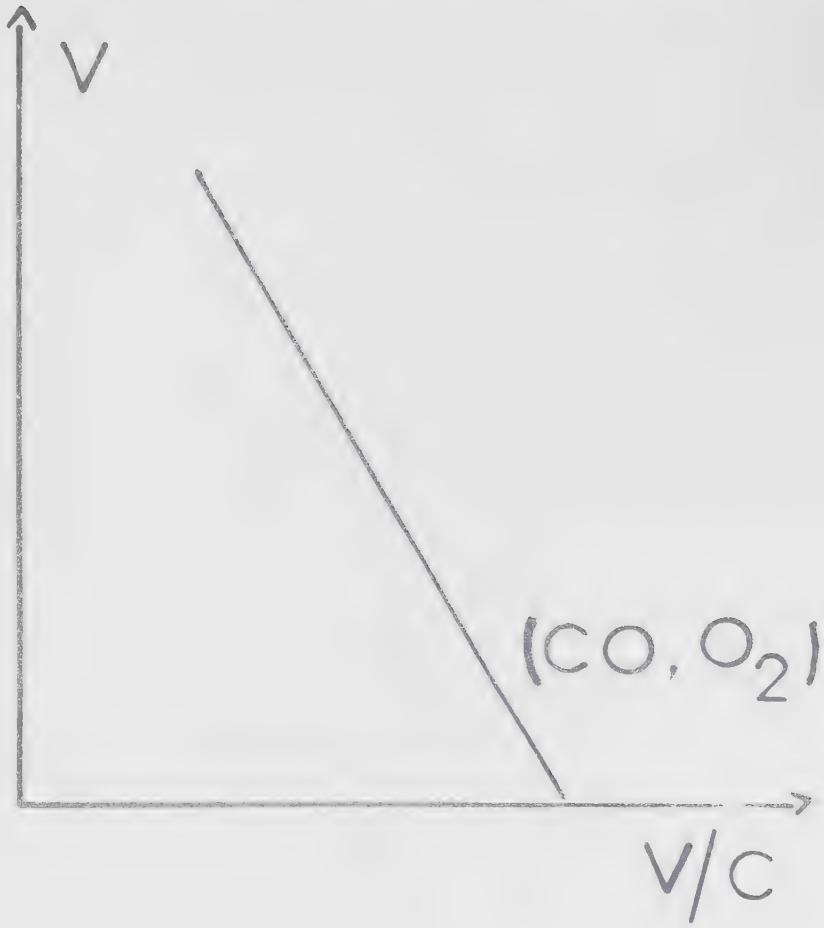
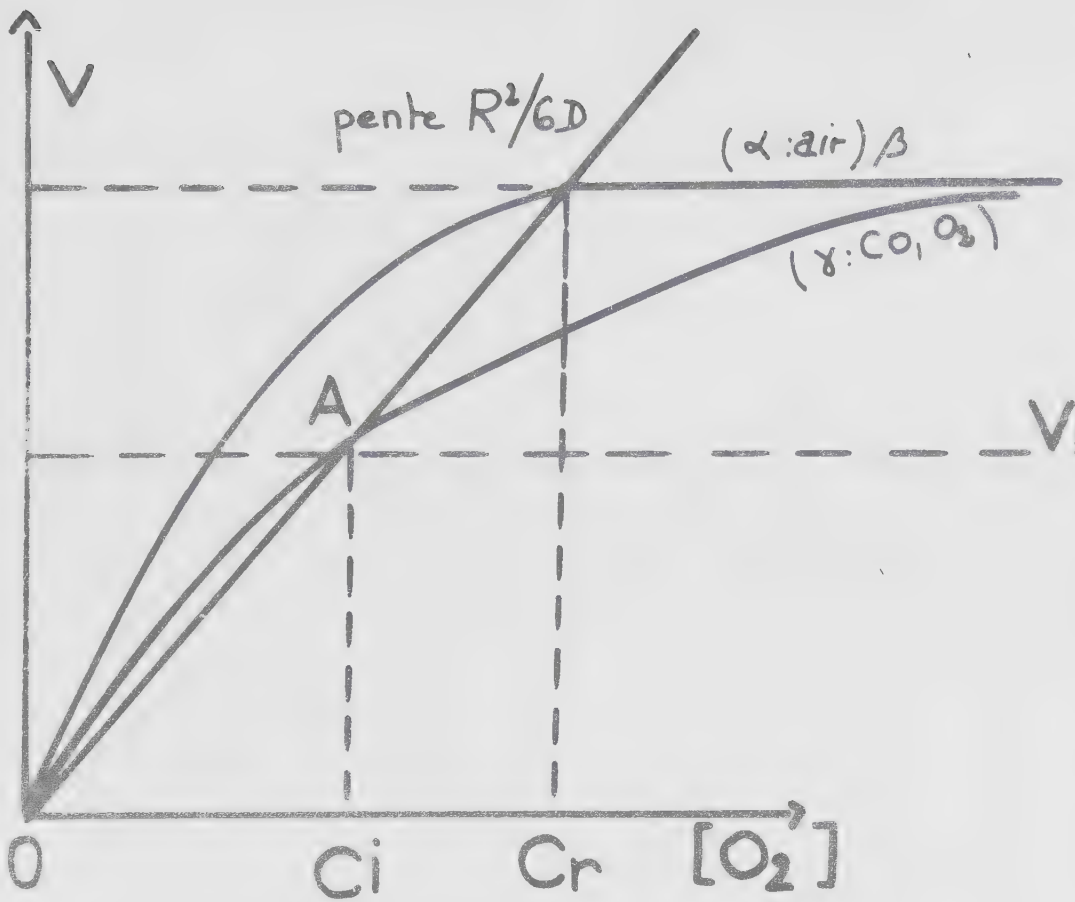

V
(CO, O_2)
V/C

Fig. 10 - Respiration dans l'air (courbe) et dans un mélange contenant une forte proportion de CO (courbe). La courbe est entièreme en dehors du domaine de limitation de la respiration par la diffusion de l'oxygène. Ce domaine est délimité par l'axe des ordo nées et la droite de pente $R^2/6\ D$ (voir texte).


V
pente $R^2/6D$
$(\alpha : air)\ \beta$
$(\gamma : CO, O_3)$
A
0
Ci
Cr
$[O_2']$

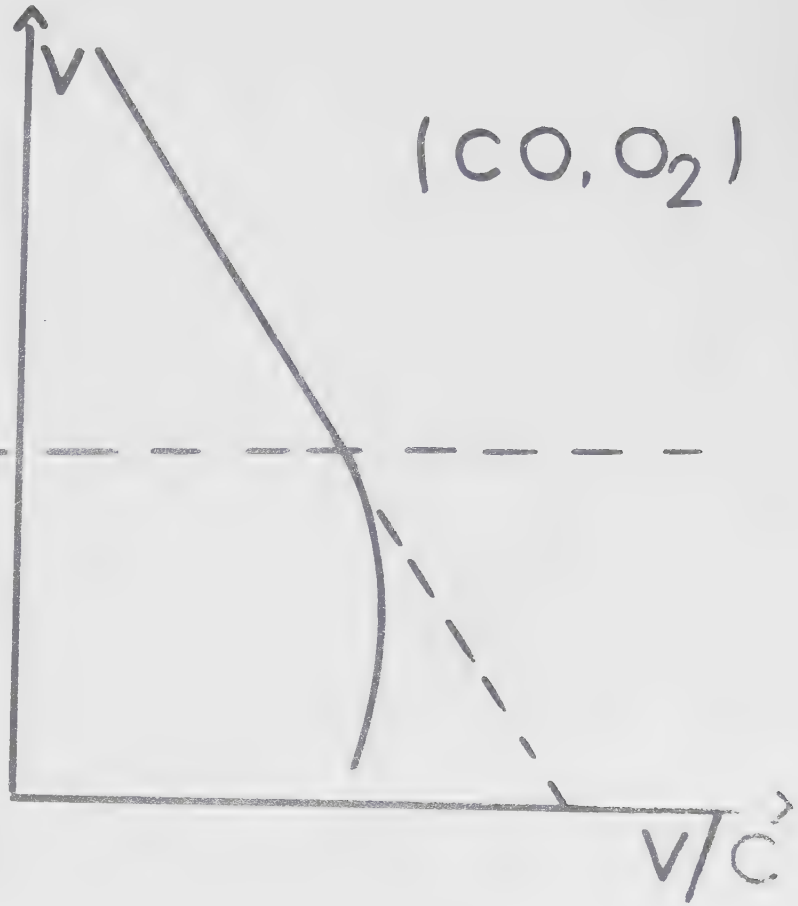

V
(CO, O_2)
V_L
V/C'

Fig. 11 - Respiration dans un mélange (CO, O_2) (courbe γ). La portion OA de la courbe représentant les respirations en présence d'oxyde de carbone est située dans le domaine de limitation de la respiration par la diffusion de O_2 à l'intérieur des cellules. La représentation en (V, V/C) correspondante est déviée par rapport à la droite de pente "$-K_m$".

CHAPITRE IV

VERIFICATION EXPERIMENTALE

Expérimentalement, les mesures sont faites simultanément avec un mélange d'oxygène et d'oxyde de carbone contenant 20 à 50 % d'oxygène et avec une fiole témoin où circule de l'eau saturée en air.

La fiole témoin nous permet de déterminer la concentration C_r dans l'air, et par conséquent la droite passant par l'origine et par C_r, de pente $R^2/6\ D$. (Fig. 12).

En présence d'oxyde de carbone la concentration C_i est alors aisément repérée par l'intersection de cette droite avec la courbe $V = f(C)$ (Fig. 12 à 15).

Les résultats expérimentaux sont conformes aux prévisions faites au chapitre précédent. En effet :

1°) Quand $C > C_i$, les valeurs expérimentales de la vitesse V et de la concentration C en oxygène se traduisent par une droite, dans la transformation classique (V en fonction de V/C), c'est ici l'expression d'un phénomène purement enzymatique. Cette concentration C_i est très faible pendant les premières heures de la survie (Fig. 12) si la concentration en oxyde de carbone est élevée dans le mélange.

Les mesures faites sur différentes souches de levures, -avec des mélanges d'oxyde de carbone et

d'oxygène qui éliminent l'effet de diffusion dans ce matériel de faible taille-, sont parfaitement en accord avec la relation 3.2.

Les représentations en (V, V/C) qui ont l'avantage de ne pas déformer l'échelle, sont linéaires (thèse de 3ème cycle CHEVILLOTTE) (Fig. 16), le V_m qui s'en déduit est souvent différent de la vitesse maximum expérimentale, et dépend de la souche étudiée.

2°) Au-dessous de la valeur C_i déterminée, il y a intéraction de deux phénomènes, et la relation $V = f(V/C)$ n'est plus linéaire. (Fig. 13 à 15).

La concentration dans le milieu "Co" est mesurée, et les vitesses "V" tirées de l'équation (3.7) sont déterminées (à l'aide du calculateur IBM 1130) dans le but de les comparer aux valeurs expérimentales.

Les valeurs de V_m et $K_{m\ ap}$ sont déduites de la cinétique de la zone de réaction enzymatique simple ($C > C_i$) pour l'échantillon en présence d'oxyde de carbone. La valeur de D est tirée des courbes de respiration dans l'air (CHEVILLOTTE, CHARBONNIER, 1969).

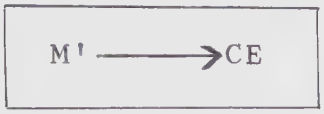
Compte tenu de l'hétérogénéité des cellules, D correspond à une valeur moyenne du coefficient de diffusion. A une température donnée, cette valeur est constante pour différentes vitesses de respiration. Si l'on suppose un rayon moyen de 50 μ pour les cellules de Pomme de terre :

$$D = 0{,}16.10^{-9}\ cm^2\ h^{-1} \text{ soit } 5{,}7.10^{-7}\ cm^2\ s^{-1}.$$

Dans la zone de diffusion réaction, les

courbes ainsi calculées coïncident bien avec nos courbes expérimentales (tableau III).

L'étape

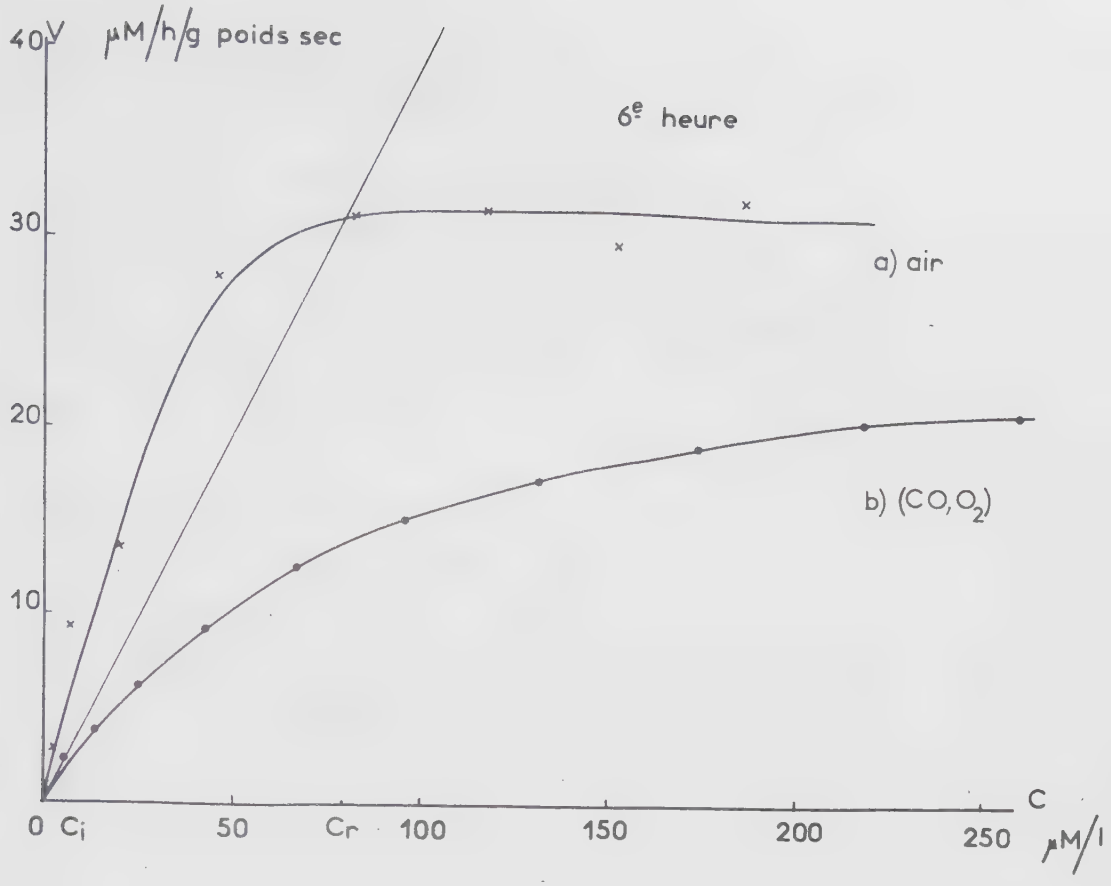


est donc ainsi réalisée.

Le modèle M est conservé qui interprète la limitation de la vitesse de respiration dans l'air par la diffusion intra-cellulaire, l'enzyme respiratoire ayant une forte affinité pour l'oxygène.

Tableau III :

Co ...	71,8	54,9	41,4	30,8	22,7	16,0	11,7	8,4	5,5	3,7	2,6
V. exp.	27,7	21,3	18,1	14,3	10,6	8,5	4,3	5,3	3,2	2,1	1,0
V. cal.	27,1	22,7	18,3	14,3	10,6	7,4	5,2	3,5	2,1	1,3	0,9


40
V µM/h/g poids sec
6e heure
30
a) air
20
b) (CO,O2)
10
0
Ci
50
Cr
100
150
200
250
C
µM/l

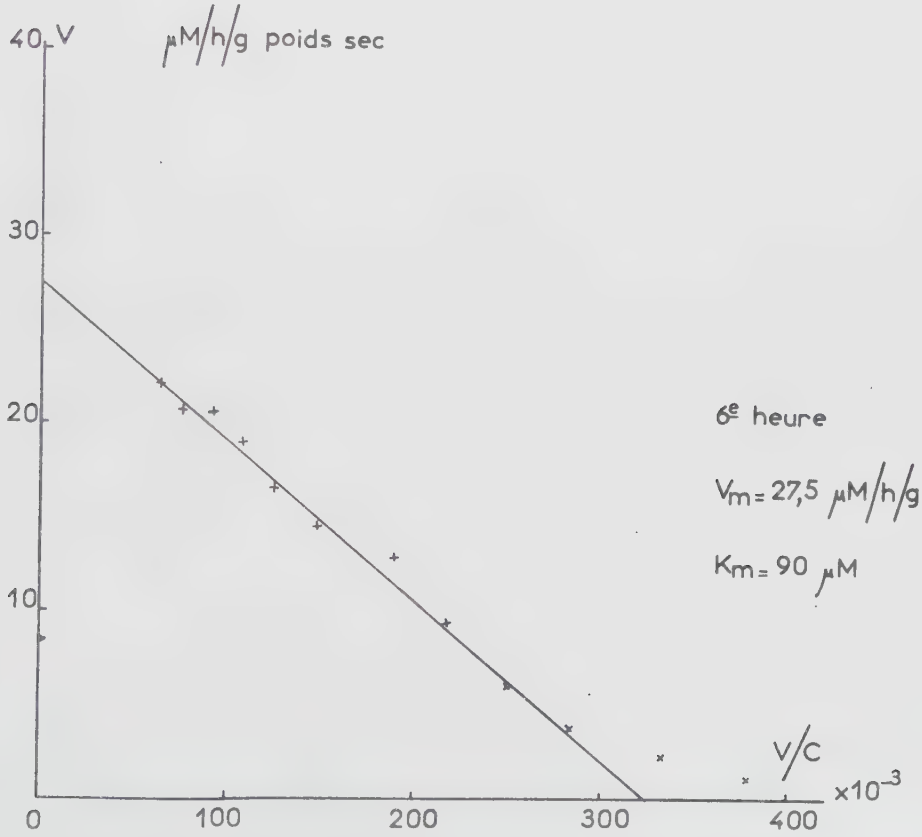
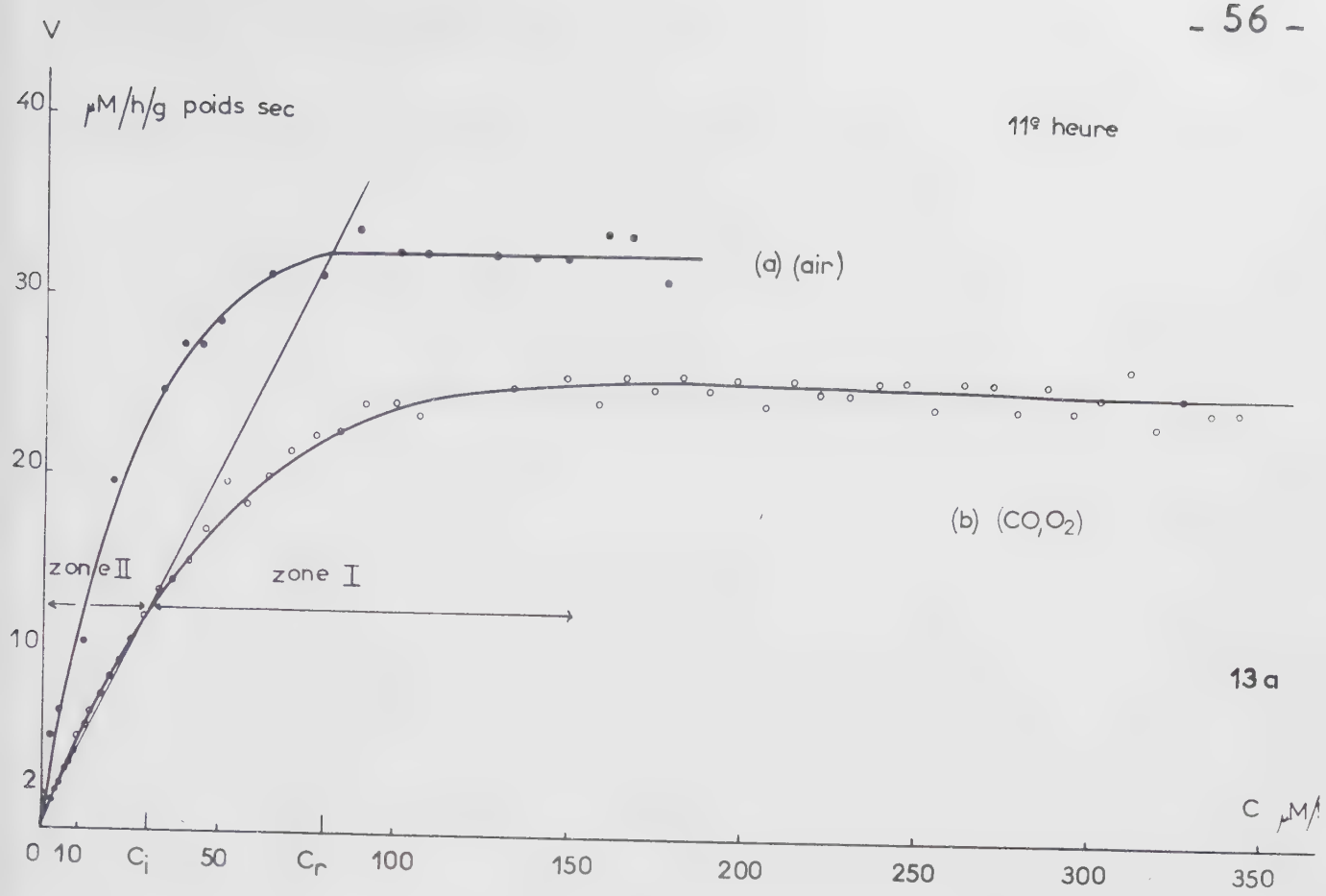

40
V
µM/h/g poids sec
30
20
6e heure
Vm = 27,5 µM/h/g
Km = 90 µM
10
V/C
×10⁻³
0
100
200
300
400

Fig. 12a- Variation de la vitesse de respiration en fonction de la concentration en oxygène, dans la sixième heure après la coupe.

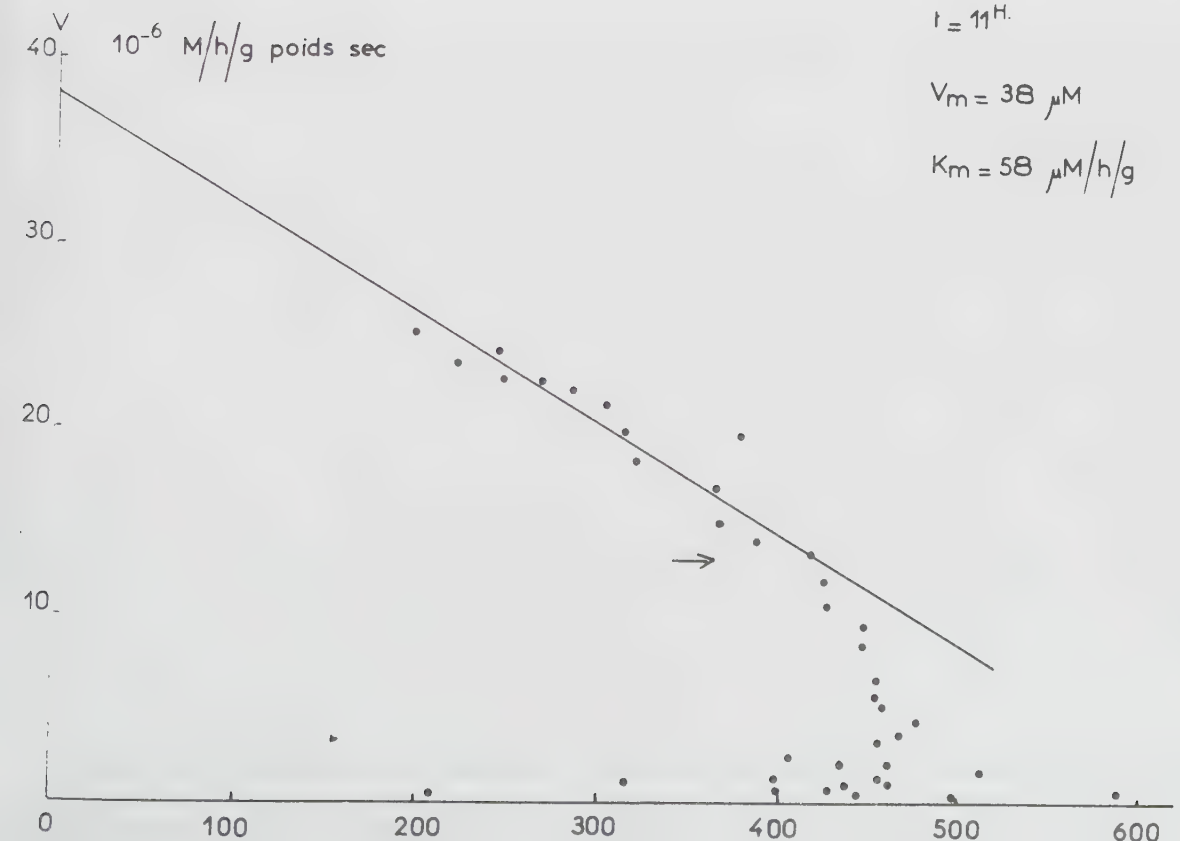
Le mélange initial (CO, O_2) contient 29 pour 100 d'oxygène et 71 pour cent d'oxyde de carbone. ($t = 25°C$). La pente de la droite est $R^2/6\ D$.

Fig. 12b- Valeurs expérimentales de la courbe b de la figure 12a portée sous la forme $V = f(V/C)$.

La relation est linéaire, sauf pour les derniers points, pour lesquels la précision est très faible.


V
40
μM/h/g poids sec
11e heure
30
(a) (air)
20
(b) (CO,O2)
zone II
zone I
10
2
0 10 Ci 50 Cr 100 150 200 250 300 350
C μM/

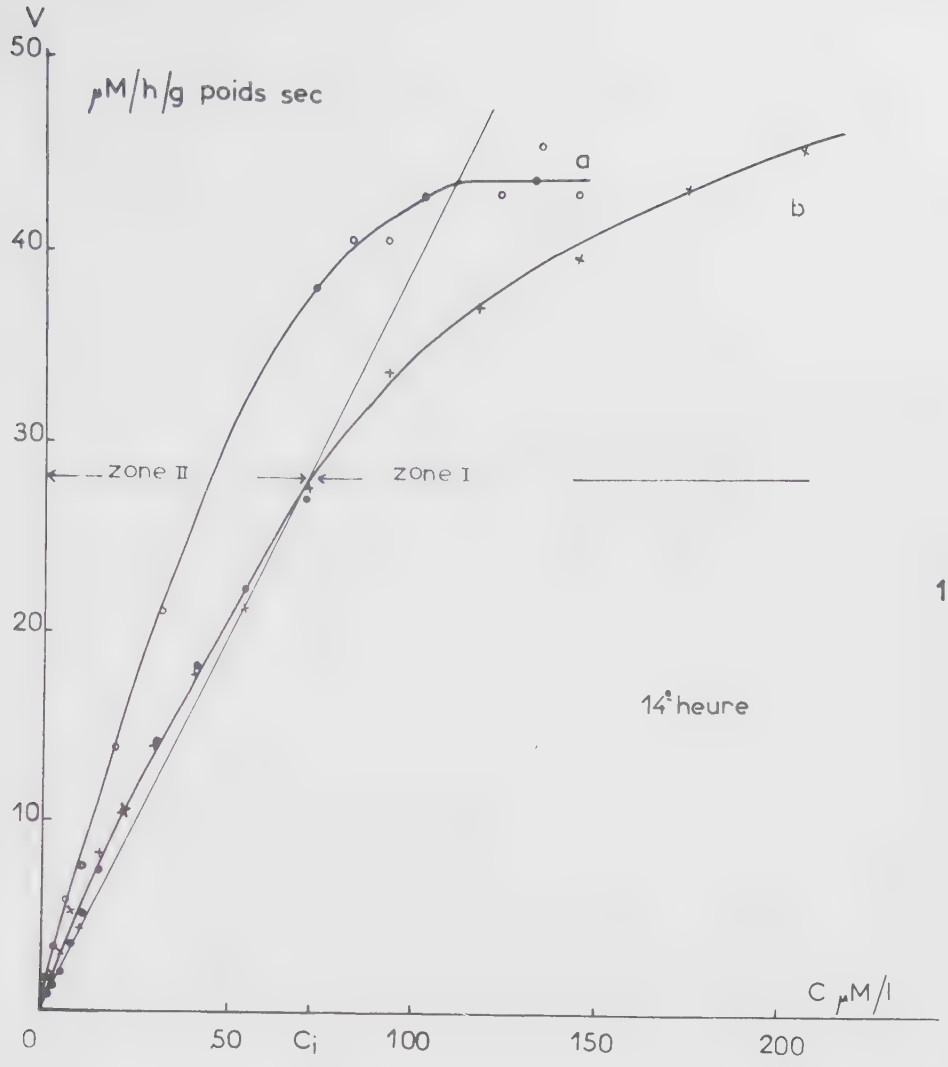
13 a


V
40
10-6 M/h/g poids sec
t = 11H.
Vm = 38 μM
Km = 58 μM/h/g
30
20
10
0 100 200 300 400 500 600
V/C

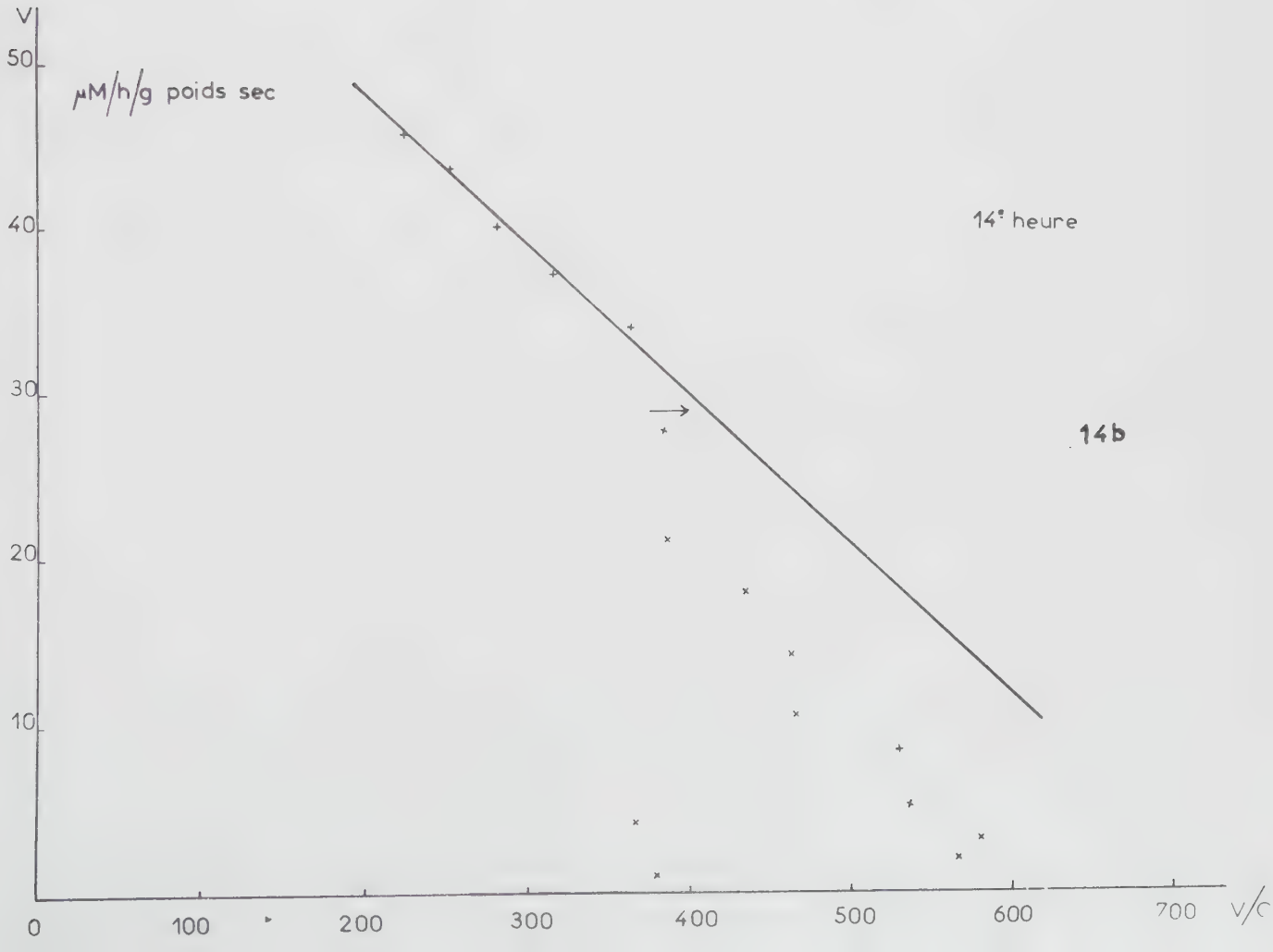
13 b

Fig. 13a- Variation de la vitesse de respiration en fonction de la tension d'oxygène au cours de la onzième heure après la coupe.
Le mélange initial (CO,O_2) contient 53 pour cent d'oxygène et 47 pour cent d'oxyde de carbone ($t = 25°C$).

Fig. 13b - Valeurs expérimentales de la courbe b de la figure 13a.
La relation est linéaire seulement dans la zone I. La flèche indique la séparation entre les zones I et II. Le palier observé pour les fortes concentrations d'oxygène correspond à la vitesse maximum mesurée expérimentalement.


V
50
µM/h/g poids sec
40
30
20
10
a
b
zone II
zone I
14° heure
C µM/l
0
50
Ci
100
150
200

14a


V
50
µM/h/g poids sec
40
30
20
10
14° heure
0
100
200
300
400
500
600
700
V/C

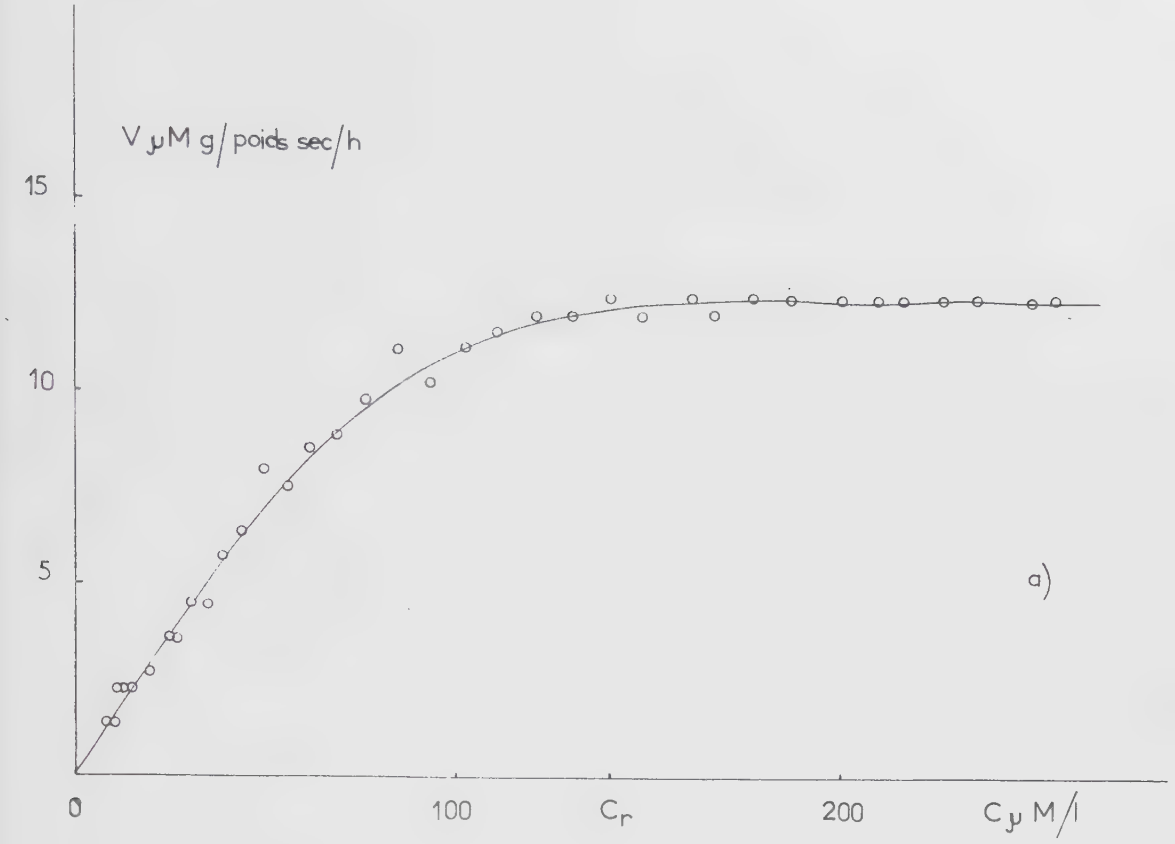
14b

FIG. 14a - Variation de la vitesse de respiration fonction de la concentration en oxygène au cours de la quatorzième heure après la coupe.

a) : Le milieu est saturé en air. b) : le milieu est saturé avec le mélange (CO, O_2) contenant 71 % de CO. Dans la zone II les croix correspondent au valeurs expérimentales et les points noirs à celle calculées d'après l'équation (3.7) (voir tableau I

Fig. 14b - Valeurs expérimentales de la courbe b de la figure 14a portées sous la forme $V = f(V/C)$.

La flèche indique la vitesse à partir de laquelle la diffusion doit théoriquement intervenir.


V µM g/ poids sec/h
15
10
5
0
100
Cr
200
C µ M/l
a)

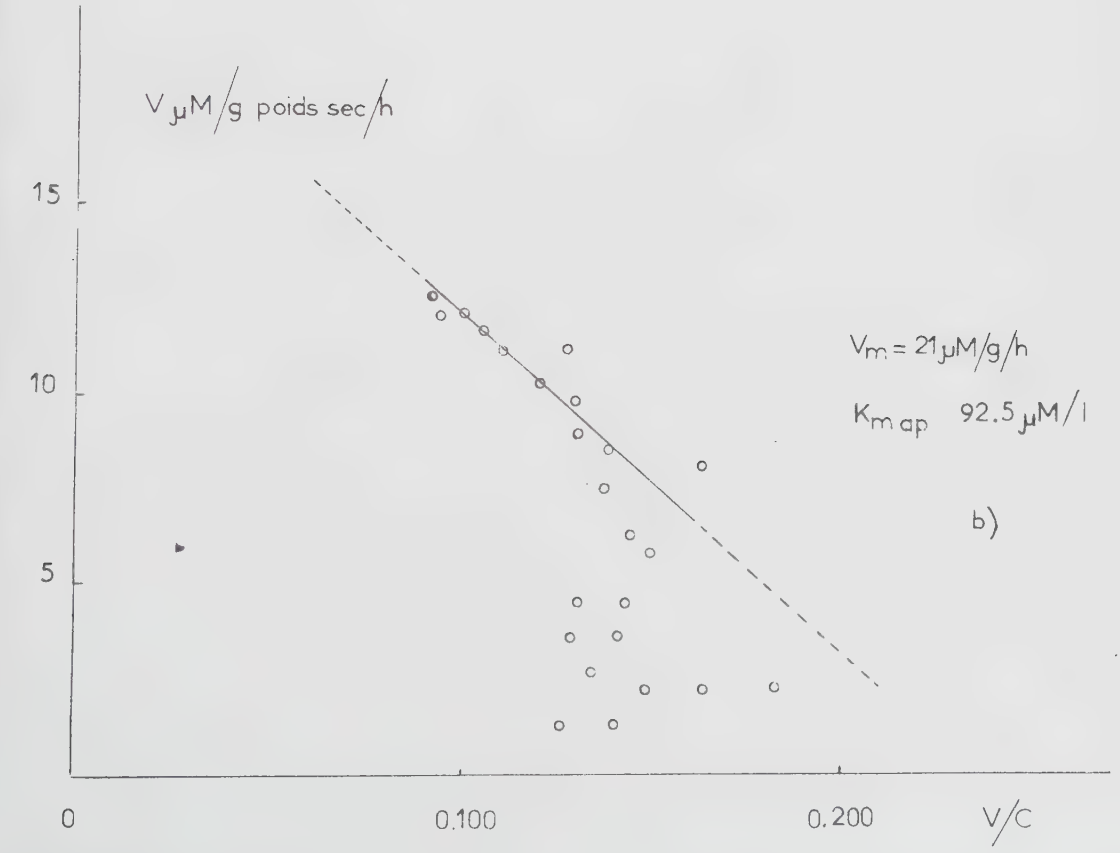
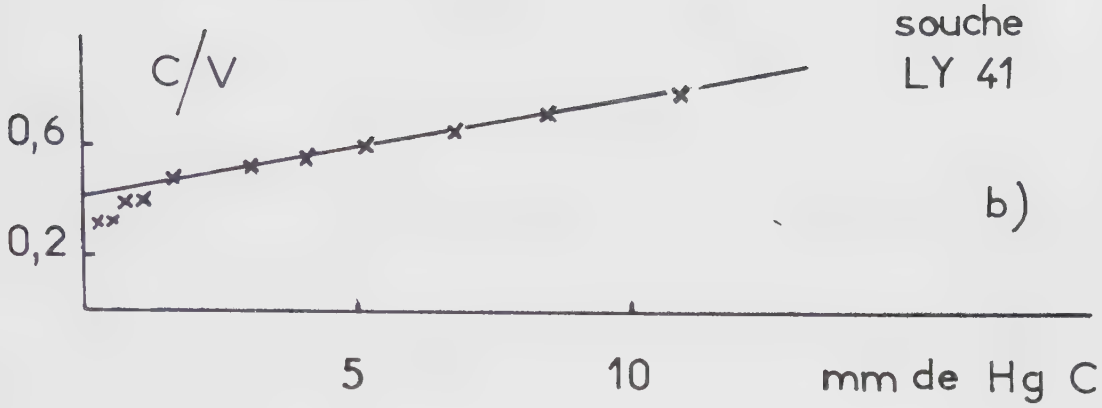

V µM/g poids sec/h
15
10
5
0
0.100
0.200
V/C
Vm = 21 µM/g/h
Km ap 92.5 µM/l
b)

Fig. 15 - Inhibition de la respiration par l'oxyde de carbone au cours de la deuxième heure de survie :

a : Variation de la vitesse de respiration en fonctio de la concentration en oxygène, avec un mélange gazeu comprenant 40 % d'oxyde de carbone et 60 % d'oxygène

b : Transformation V en fonction de V/C. En dessous de la concentration critique, et jusqu'à une certaine vitesse, cette transformation est linéaire. En dessou dans la zone de faibles concentrations, l'écartement par rapport à la droite peut s'interpréter comme la limitation par la diffusion de la réaction entre l'oxygène et l'enzyme.


souche
LY 41
C/V
0,6
0,2
b)
5
10
mm de Hg C

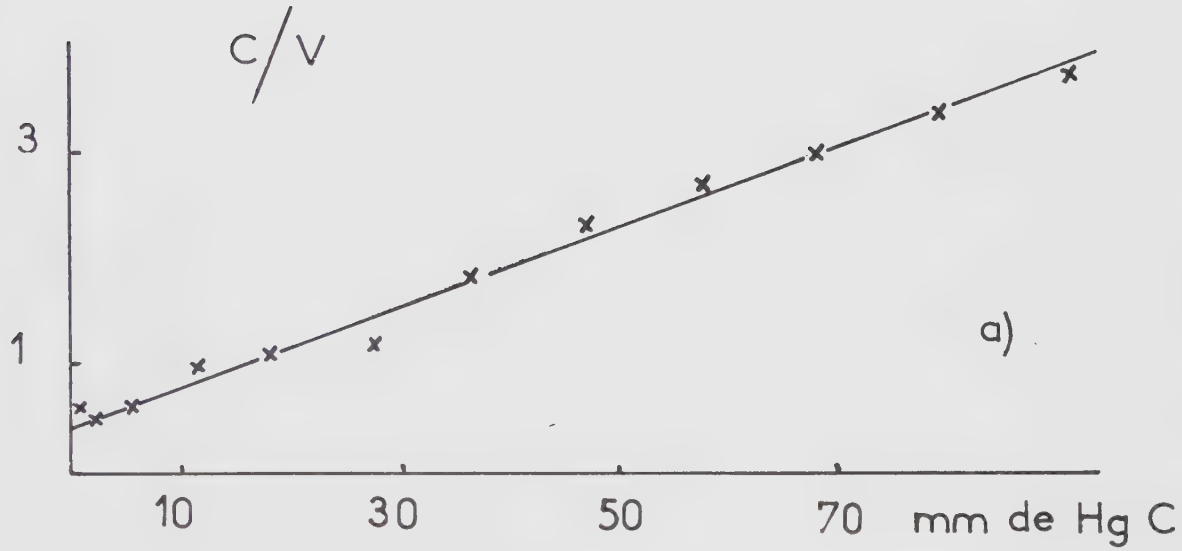

C/V
3
1
a)
10
30
50
70
mm de Hg C

Fig. 16 - Mesure de vitesses de respiration de levures en fonction de la concentration en oxygène. La zone 1 à 10 mn de Hg de la courbe a est agrandie, en enregistrant à nouveau avec une plus grande sensiblilité du gavalnomètre(b).

CHAPITRE V

VERIFICATION OU EXPLICITATION DES PRINCIPALES HYPOTHESES UTILISEES

5.1 Vérification de l'hypothèse H_j^1 : "K_m" indépendant de $(pO_2)_{50}$.

5.11 Principe :

Dans cette étude, nous nous sommes volontairement limités aux premières heures de la survie, pendant le temps de latence qui précède l'augmentation rapide de la respiration et les transformations qui en découlent. La concentration qui donne une vitesse moitié de la vitesse maximum expérimentale dans l'air "$(pO_2)_{50}$", varie entre 6 et 10.10^{-6} M/l (selon la vitesse maximum atteinte).

Le K_m apparent, calculé lors de l'inhibition compétitive par l'oxyde de carbone est donné par la formule (3.3).

$$K_{m\ ap} = K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)$$

Cela revient à appliquer à K_m la transformation T. Si l'hypothèse H_j^1 est valide, le K_m réel qui est celui observable au niveau mitochondrial

(de l'ordre de 10^{-8} M/1), est négligeable devant le deuxième terme de (3.3)

$$(5.1) \qquad K_{m\ ap} \approx \frac{K_m}{K_i} [I]$$

Il y a alors proportionnalité entre le $K_{m\ ap}$ mesuré et la concentration en inhibiteur.

5.12 Matériel et méthode :

L'expérimentation est assez délicate à cause de la lourdeur de l'appareillage qui nécessite deux circuits indépendants de circulation de mélanges gazeux, alimentant chacun une fiole où sont placées les tranches de Pomme de terre de 1 mm d'épaisseur. Ces mélanges contiennent 40 à 80 % d'oxyde de carbone.

Dans la zone où la relation entre V et C est hyperbolique, nous appliquons les méthodes statistiques basées sur les calculs des moindres carrés en mettant les données soit sous la forme $V = f(V/C)$, soit sous la forme intégrée :

$$(5.2) \qquad t = \frac{Co - C}{V_m} + \frac{K_{m\ ap}}{V_m} \text{Log} \frac{Co}{C}$$

qui permet d'utiliser sans les transformer les valeurs mesurées C et t.

Nous en déduisons le K_m apparent.

Par l'étude de la dispersion, -aléatoire ou non-, des signes des écarts à la valeur moyenne

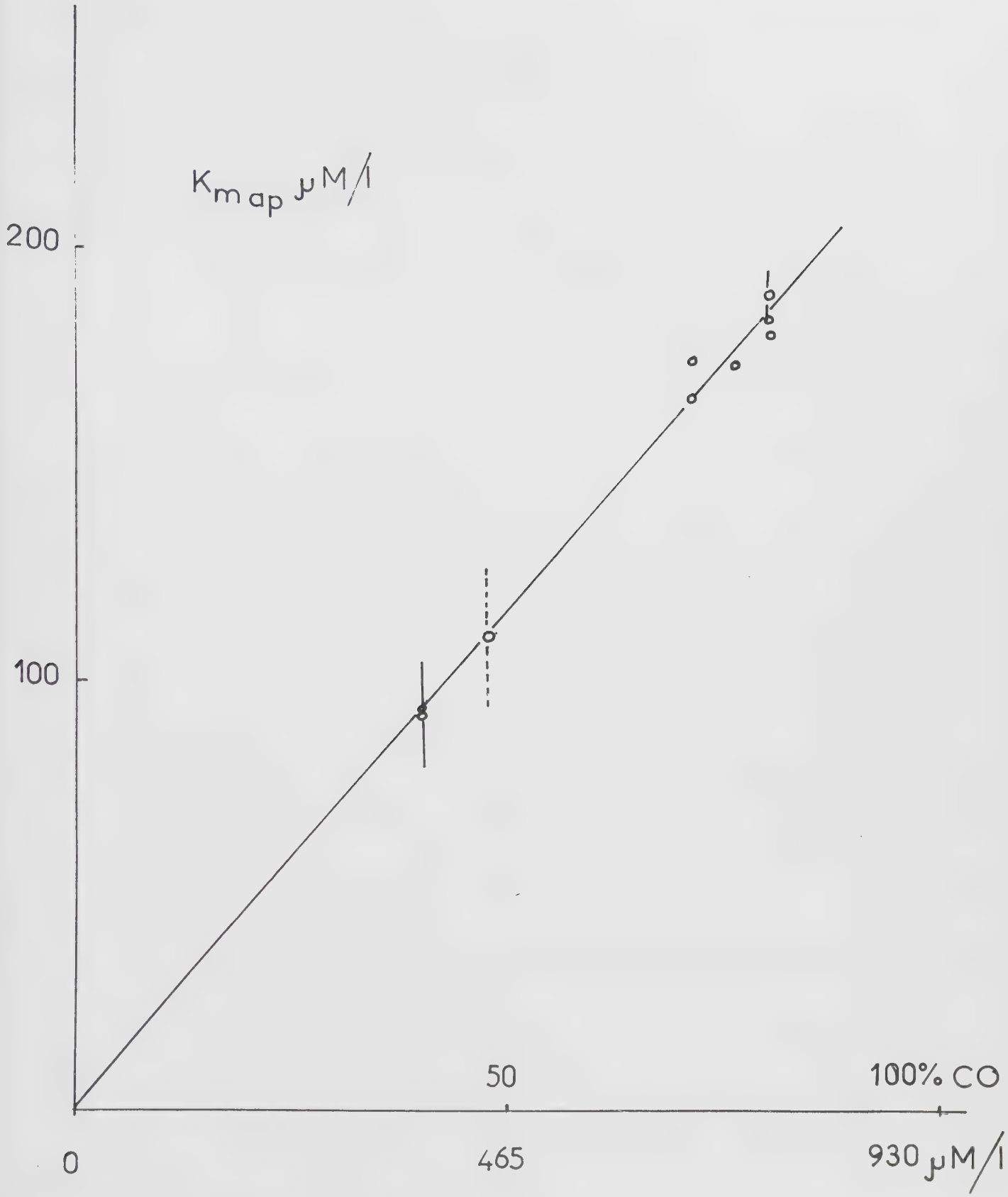

$K_{m\,ap}$ µM/l
200
100
0
465
930 µM/l
50
100% CO

Fig. 17 - $K_{m\ apparent}$ déduit des mesures expérimentales, en fonction de la concentration en inhibiteur. Ces points résultent de diverses expériences réalisées avec plusieurs mélanges d'oxyde de carbone et d'oxygène, à 25°C. Les mesures de concentrations en fonction du temps sont faites entre la deuxième heure et la quatrième heure de survie.

le programme utilisé (régression multilinéaire, centre de calcul de St. Jérôme) permet de tester l'adéquation du modèle choisi. Signalons cependant que cette étude ne peut avoir qu'une valeur indicative car nos conditions expérimentales ne correspondent pas exactement aux conditions d'applicabilité de ces méthodes (il faut que l'erreur sur C puisse être considérée comme nulle, et de plus pour la première forme énoncée que V et V/C soient stochastiquement indépendants : erreur sur V indépendante de l'erreur sur "V/C"). Cela permet cependant de savoir si le modèle peut être retenu.

5.13 Résultats :

La relation (5.1) est vérifiée avec une assez bonne précision (CHEVILLOTTE (1971)). (Fig. 17). Le rapport K_i/K_m est égal ici à 4.05. Si la constante d'équilibre K_i est de l'ordre de celle mesurée par WALD et ALLEN (1957) pour l'oxydase du muscle de coeur avec CO ($3,5.10^{-7}$ M) le K_m serait d'environ 8.10^{-8} M, ce qui correspondrait bien aux valeurs des K_m mesurés avec des mitochondries. De même SCHINDLER (1964) trouve pour des particules (ETP) une constante $K_i = 4,4 \pm 1,0.10^{-7}$ M, du même ordre de grandeur que celle utilisée ci-dessus.

5.2 Explicitation de l'hypothèse H_j^2 :

$$V = \frac{V_m\ C}{K_m + C}$$

Le formalisme classique de LINEWEAVER-BURK (1954), ou celui utilisé par WARBURG (1923) pour

son "ferment transporteur d'oxygène" conduisent dans l'état stationnaire à une vitesse d'utilisation de l'oxygène au niveau de l'oxydase terminale :

$$V = \frac{V_m \, C}{K_m + C} \qquad (5.3)$$

et c'est ce que l'on s'attend à trouver quand on mesure la cinétique de disparition de l'oxygène avec les mitochondries dans l'état 3 de respiration, la chaîne de transporteurs étant saturée en substrat fournisseur d'ions H^+ et la cytochrome oxydase ayant une grande affinité pour l'oxygène.

5.21 Coefficient 1.4 de BAENDER et KIESE (1955).

Cependant, une relation fréquemment adoptée pour exprimer la variation de la vitesse de respiration en fonction de la concentration d'oxygène est celle formulée par BAENDER et KIESE. Ces auteurs trouvent que leurs résultats expérimentaux sur des mitochondries (matériel qui élimine la diffusion dans la cellule) ne vérifient pas l'équation (1.3) mais se traduisent par :

$$V = \frac{R_m \, C^{1.4}}{K_m + C^{1.4}} \qquad (5.4)$$

Nous avons remplacé le symbole V_{max} utilisé par BAENDER et KIESE par le symbole équivalent dans nos notations : R_m, pour souligner que ce paramètre correspond à une vitesse maximum expérimentale dans un mélange (O_2, N_2).

Cette formule est déduite empiriquement de la représentation "Log (V/R_m - V) en fonction de Log C qui fournit une droite de pente 1,4. Outre que l'emploi d'une représentation en (R_m-V) est mathématiquement suspecte (un faible écart dans la mesure de R_m peut entraîner une variation importante du coefficient de C : REICH, 1970), remarquons que l'hypothèse fondamentale de BAENDER et KIESE pour établir la relation 5.4 est que la vitesse maximum correspond à : $F_e^{2+} = 0$, c'est-à-dire à une oxydation totale du cytochrome. Or BAENDER et KIESE affirment d'autre part (en accord avec d'autres auteurs) que pour des préparations de Keilin-Hartee ayant atteint la vitesse maximum de respiration, (R_m) le pourcentage d'oxydation mesuré est seulement 87 %.

$$\frac{F_e^{3+}}{F_e^{2+} + F_e^{3+}} = 0,87 \qquad (5.5)$$

ce qui correspond avec nos notations à :

$$V_m = 1.14\ R_m$$

V_m représentant la vitesse maximum théoriquement accessible si l'oxydation de l'oxydase était de 100 % (V_m de la formule 5.3)

SCHINDLER (1964) indique par ailleurs qu'un taux d'oxydation fréquemment trouvé avec divers matériaux est 70 %. Ceci correspondrait à :

$$V_m = 1.4\ R_m$$

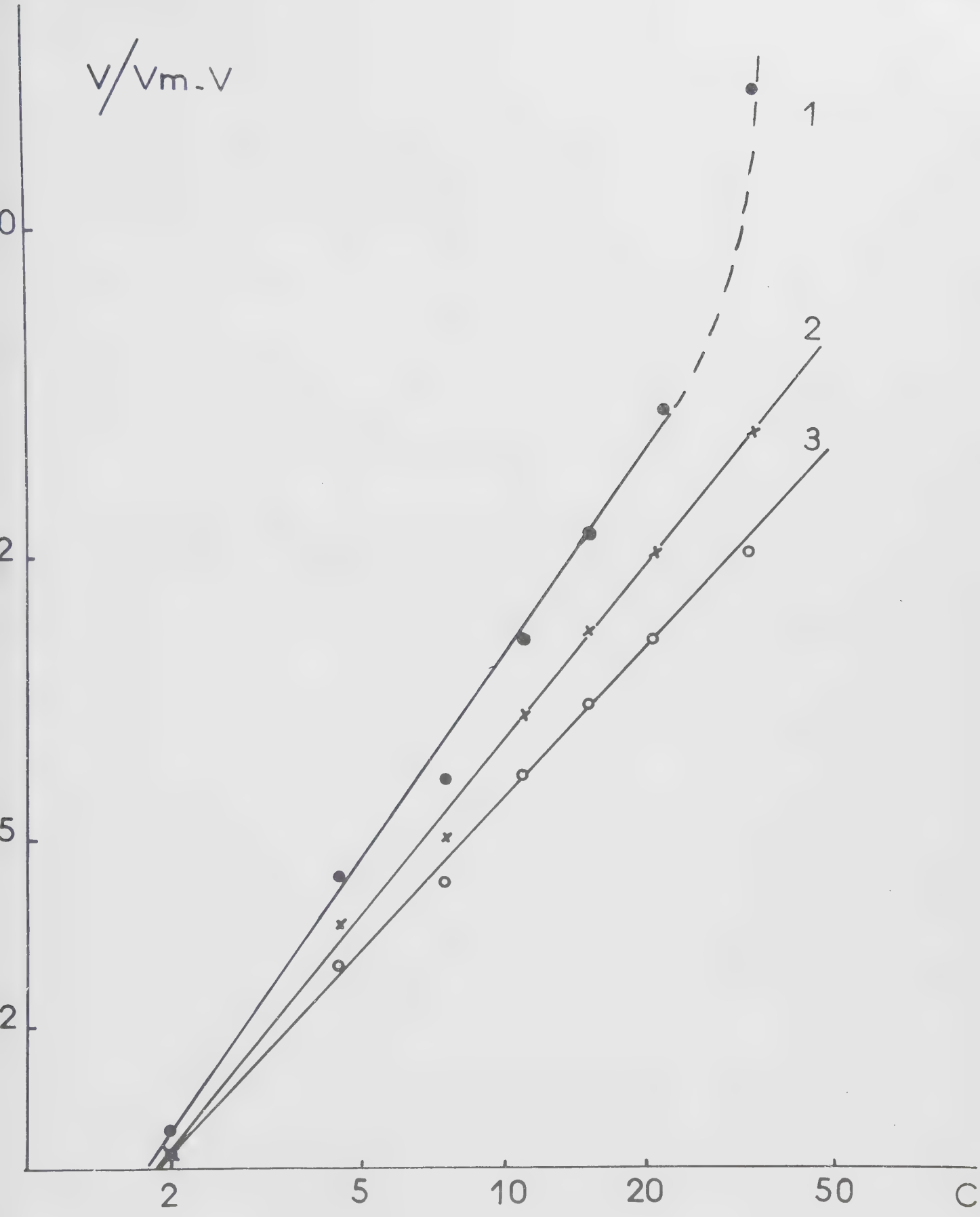

V/Vm.V
1
2
3
0
2
5
2
2
5
10
20
50
C

Fig. 18 - D'après les données de BAENDER et KIESE (1957, p. 313, Fig. 1) pour les mitochondries de foie de rat à 20°C, en coordonnées logarithmiques.

1- $V_m = R_m$, droite de pente 1,4, identique à celle de BAENDER et KIESE.

2- Points calculés d'après les mêmes données, mais en prenant $V_m = 1,14\ R_m$ correspondant à 87 % d'oxydation (valeur signalée par plusieurs auteurs pour des préparations de KEILIN HARTREE) ; droite de pente 1,2.

3- Points calculés à partir des mêmes données mais avec $V_m = 1,4\ R_m$, correspondant à 70 % d'oxydation (valeur utilisée par SCHINDLER, 1964) ; droite de pente 1.08.

Tableau IV : Valeurs calculées d'après la Fig. 1 de BAENDER et KIESE (p. 312, 1955).

P_{O_2}	V	1/V	$1/P_{O_2}$	V/P_{O_2}	$V/(V_m - V)$	V_m th. = 1,2 R_m (87 % oxydation) $V/(V_m - V)$	V_m th. = 1,4 R_m (70 % oxydation) $V/(V_m - V)$
2	3,75	266 $.10^{-3}$	500 $.10^{-3}$	187 $.10^{-3}$	0,12	0,10	0,084
4,5	9,5	105 -	222 -	211 -	0,42	0,42	0,267
7,5	13	76,9 -	133 -	173 -	0,68	0,51	0,41
11	18,5	54,0 -	90,9 -	168 -	1,37	0,92	0,704
15	22,5	44,4 -	67 -	150 -	2,14	1,41	1
20,7	26,0	38,4 -	48,3 -	125,6 -	4,3	2,08	1,38
33,5	30,5	32,7 -	29,8 -	90,7 -	20,3	3,81	2,13

Si l'on porte alors "$V/(V_m-V)$" en fonction de "C" en coordonnées logarithmiques, la représentation obtenue est à nouveau une droite, dont la pente dépend de la valeur V_m utilisée ; c'est ainsi que les données de BAENDER et KIESE concernant les mitochondries de foie de rat (1955, Fig. 1 p. 313) se traduisent successivement :

- Par une droite de pente 1.4, si le V_m utilisé est la vitesse maximum expérimentale (R_m) (identique à la droite 2 de la figure 2 de BAENDER et KIESE (p. 314).

- Par une droite de pente 1.2 si on suppose un taux d'oxydation de 87 %, correspondant à une vitesse expérimentale égale 1,14 fois la vitesse maximum théoriquement accessible.

- Par une droite de pente 1.08 si ce taux d'oxydation est supposé être égal à 70 %.(Fig. 18 droites 1, 2, 3 et tableau IV).

Remarquons d'ailleurs que le point correspondant à environ 90 % de la vitesse maximum expérimentale qui s'écarte notablement de la droite de pente 1.4, est aligné sur les droites de plus faible pente. Or ces points correspondent à la meilleure précision expérimentale.

Ces mêmes données se traduisent par des droites dans les représentations de type LINEWEAVER-BURK ($1/V = f(1/C)$ et $V = f(V/C)$), (Fig. 19 et 20). Seul le point correspondant à 10 % de la vitesse maximum expérimentale est en dehors, mais c'est aussi

celui sur lequel porte la plus grande incertitude (25 %).

La vitesse maximum que l'on peut déduire de ces droites, V_m, est égale à 1,5 fois la vitesse expérimentale ce qui correspondrait à un taux d'oxydation de 65 % pour l'oxydase.

Il est donc légitime de dire que les résultats expérimentaux obtenus avec les mitochondries vérifient la relation (5.3) : le V_m (déduit d'une représentation en V, V/C ou 1/V, 1/C) représente alors non la vitesse maximum expérimentalement mesurée, mais la vitesse théoriquement accessible si l'oxydation de l'oxydase était totale. La cinétique semble être celle de l'enzyme terminal (caractéristique identique au cas d'un enzyme simple) mais la vitesse maximum de la réaction est limitée par les autres cytochromes de la chaîne ("cushioning effect" (DIXON et WEBB, 1964)). Le rapport R_m/V_m correspondrait au taux d'oxydation de l'oxydase.

D'autre part, la formule empirique 5.4, si elle semble ajustée aux données expérimentales, conduit à certains résultats contradictoires :

a) Les données de HEGNER et GLOSSMANN (1955) conduisent à différentes valeurs pour l'exposant de C, selon le matériel utilisé (sarcosomes, bactéries, mitochondries) et les conditions expérimentales (R_m, température, etc...).

b) Quand la concentration en substrat (O_2) est faible, de telle sorte que $C \ll K_m$, la relation (5.4) implique une vitesse de réaction d'ordre fractionnel, au lieu du premier ordre expérimentalement observé par SCHINDLER (1954).

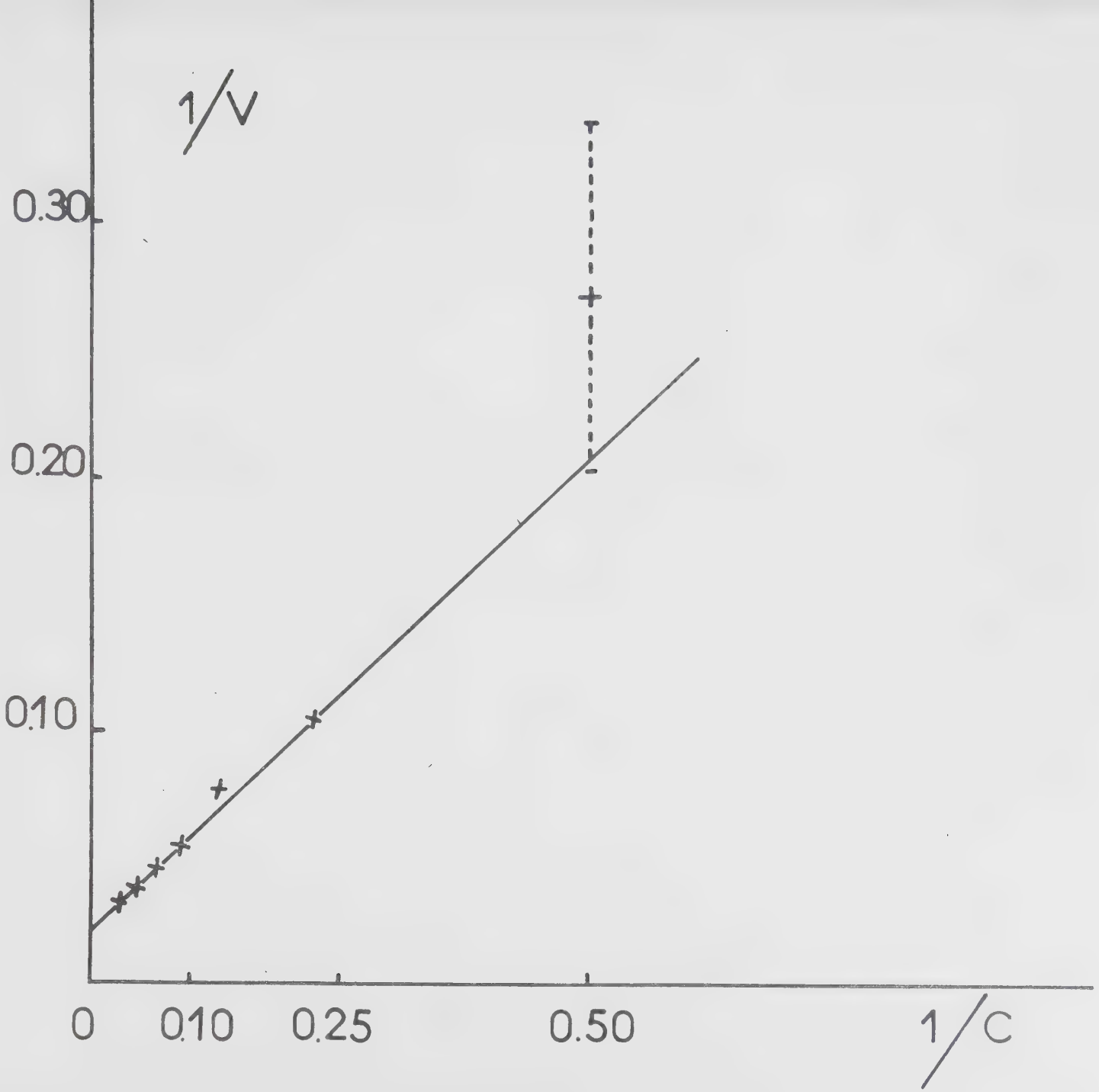

1/V
0.30
0.20
0.10
0
0.10
0.25
0.50
1/C

Fig. 19 - Données de BAENDER et KIESE dans la représentation en (1/V, V/C). En unités arbitraires le V_m qui s'en déduit est égal à 50, alors que $R_m = 32$.

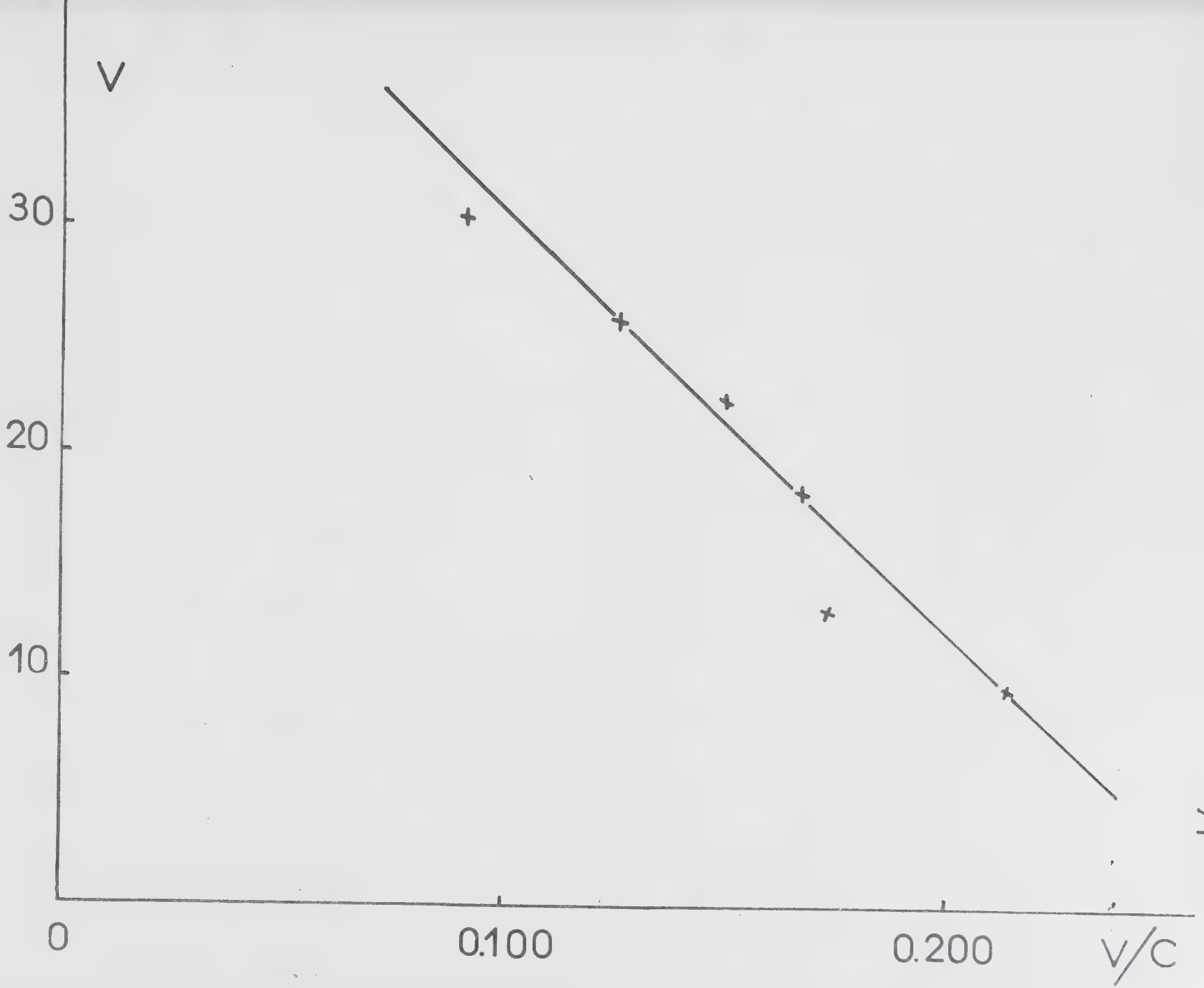

V
30
20
10
0
0.100
0.200
V/C

Fig. 20 - Données de BAENDER et KIESE dans la représentation (V, V/C). En unités arbitraires le V_m qui s'en déduit est égal à 49 (R_m = 32), ce qui correspondrait à 65 % d'oxydation pour l'oxydase terminale.

$$V = \frac{R_m \, C^{\alpha}}{K_m} \qquad (5.6)$$

c) Comme nous le verrons plus loin, cela n'explique pas le comportement en présence d'oxyde de carbone, qui peut être déduit par contre à partir de la relation (5.3). (Chapitre VI).

5.22 Mesure du taux d'oxydation de l'oxydase terminale "in vivo"

Précédemment (CHEVILLOTTE, thèse de 3ème cycle (1964)), des résultats obtenus en inhibant par l'oxyde de carbone diverses souches de levures faisaient ressortir deux catégories de levures : pour les unes :

$$r = \frac{V_m}{K_m} = 1$$

pour les autres: r = 2

Il semblait intéressant de mesurer le taux d'oxydation de l'enzyme terminal "in vivo" et de le comparer à r déduit des courbes d'inhibition ($V = f(V/C) \rightarrow K_{m\ ap}$ et V_m).

De nombreux essais avec le ferricyanure comme source supplémentaire d'électrons, au niveau du cytochrome c, se montrèrent infructueux : il fallait travailler dans la région à la limite de la précision du spectromètre à double faisceau du laboratoire. Pour les souches où r = 2, le taux d'oxydation était cependant plus élevé en présence de ferricyanure.

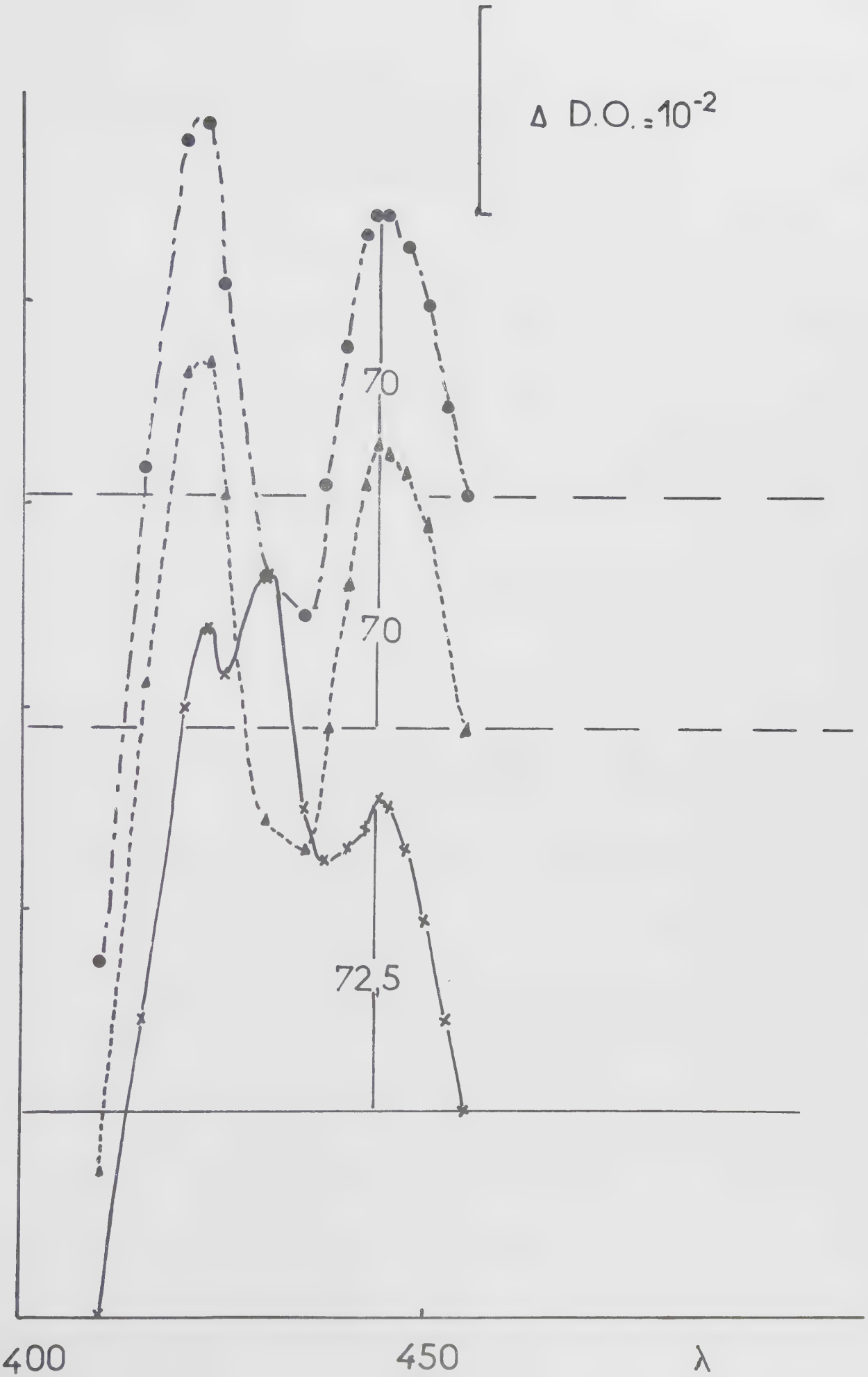

Δ D.O. = 10^{-2}
70
70
72,5
400
450
λ

Fig. 21 - Spectre de différences de levures pour lesquelles $V_m = R_m$.

- • Antimycine (anaérobiose) moins anaérobiose hydrosulfite)
- ▲ Antimycine (hydrosulfite) moins anaérobiose (hydrosulfite)
- X Aérobiose (hydrosulfite) moins anaérobiose hydrosulfite).

(Le terme entre parenthèse indique la cuve prise comme ligne de base).

L'utilisation de l'Antimycine A en milieu oxygéné s'est révélée plus intéressante : le transfert d'électrons est bloqué au niveau du cytochrome b, et l'on peut ainsi obtenir l'oxydation totale des cytochromes $(a\text{-}a_3)$ et c. Mais la pénétration dans la cellule est assez lente, et il faut incuber pendant environ 10 mn, en oxygénant fortement. Les spectres de différence obtenus avec une souche pour laquelle :

$R_m = 20$ (unités arbitraires)
$V_m = 20,5$ (valeur déduite d'après la courbe réalisée à l'oxygraphe en présence de CO et transformée en $V = f(V/C)$.

donnent le même taux d'oxydation pour $(a\text{-}a_3)$ complètement oxydé que dans l'état 3 de respiration (spectres de la fig. 21).

Ceci corrobore notre interprétation.

(5.3) Discussion de l'hypothèse H_j^2 : $De > Di$ Construction de modèles à deux phases.

Cette hypothèse, qui attribue au coefficient de diffusion intra-cellulaire une valeur très inférieure au coefficient de diffusion extra-cellulaire donne à la diffusion intra-cellulaire un rôle prépondérant, du moins tant que l'épaisseur du tissu est faible (peu de couches de cellules dans une tranche).

(5.31) Données de la bibliographie sur les coefficients de diffusion :

Elles sont extrêmement variées, mais peuvent cependant se regrouper en quelques catégories.

a) Coefficient de KROGH :

KROGH (1919, 1929) trouve un coefficient de diffusion de l'oxygène dans le muscle de $1,4.10^{-5}$ unité de Krogh. Cette unité particulière est la quantité de gaz qui diffuse par minute à travers une épaisseur de tissu de 1 μ d'épaisseur et de 1 cm^2 de surface quand la différence des pressions partielles du gaz qui diffuse est de, une atmosphère.

Une unité de Krogh vaut $5,6.10^{-5}$ cm^2 s^{-1}. Le coefficient de diffusion pour le muscle s'exprime alors :

$$D = 0,78.10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}.$$

b) Coefficient de diffusion mesuré dans l'espace extra-cellulaire :

KEYNES (1954) mesure le flux de potassium dans l'espace extra-cellulaire des muscles et trouve un coefficient D de $3,1.10^{-6}$ cm^2 s^{-1}. L'espace extra-cellulaire est évalué à 27 % du volume du tissu.

Mac LENNAN (1956) mesure la diffusion du potassium, de l'insuline et du thiocyanate à l'aide de traceurs radioactifs. Les coefficients trouvés sont de l'ordre de 10^{-6} cm^2 s^{-1}, et sont proches de ceux connus pour les solutions dans les mêmes conditions.

Le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau est lui, de $2,6.10^{-5}$ cm^2 s^{-1} à 25°C.

c) Dans le cytoplasme dépourvu de membrane :

LOVTRUP, MILD et BERGLUND (1970), MILD (1971) analysent la diffusion de l'eau dans le cytoplasme d'oocytes, dont la membrane plasmique a été détruite par traitement chimique (par exemple digitonine). La vitesse de diffusion mesurée est 50 à 75 % de celle de la diffusion libre, ce qui correspond à un coefficient de diffusion D = 0,8 à $1,5.10^{-6}$ cm^2 s^{-1}, selon le traitement chimique subi. Les auteurs précisent que "ces résultats ne sont pas applicables aux cellules normales où les structures membranaires variées peuvent affecter ce processus".

De cette catégorie, on pourrait rapprocher les résultats obtenus par TAKAHASHI, FATT, GOLSTICK (1966) sur la cornée, considérée comme tissu homogène. La valeur de D pour l'oxygène est $5.10^{-6} \pm 1,8.10^{-6}$ cm^2 s^{-1} à 25°C. Le fait que ces cellules soient transparentes laisse penser qu'elles possèdent peu de système membranaire intra-cellulaire.

d) Dans les membranes :

ROSE et QUINN (1967) indiquent une perméabilité pour une petite molécule comme l'azote (par conséquent proche de l'oxygène) d'environ 2.10^{-2} cm s^{-1} pour un film de 1200 Å, ce qui correspondait à un coefficient de diffusion de l'ordre de $2,5.10^{-7}$ cm^2 s^{-1}. MASSARO (1969) pense que des membranes ayant un contenu élevé de chitine, ou présentant un haut degré de calcification opposeraient une barrière plus importante à la diffusion de l'oxygène qu'un film stéarique.

LIPPE (1969) signale que les coefficients

de perméabilité mesurés sur des membranes artificielles sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés pour les membranes biologiques.

e) Dans le cytoplasme ayant des structures membranaires :

DICK (1959) donne des valeurs s'étageant de $1,5.10^{-8}$ à $5,0.10^{-10}$ cm^2 s^{-1} pour l'eau dans le cytoplasme de diverses cellules biologiques, alors que le coefficient de diffusion propre de l'eau est 10^{-5} cm^2 s^{-1} (mesurés par des méthodes osmométriques).

FENICHEL et HOROWITZ (1963) ont déterminé par des méthodes de radioactivité, des valeurs qui vont de 3.10^{-10} à 3.10^{-8} cm^2 s^{-1} pour dix composés inertes dans des fibres isolées de muscle de grenouille. (Ethanol, méthanol...). Ces auteurs indiquent que "bien que dans des conditions spéciales le protoplasme puisse être liquide, sa viscosité habituelle est très élevée".

SEIFRIZ (1936) note une viscosité de 800 à 8000 centipoises, et ALLEN (1961) signale un ordre de grandeur analogue pour l'endoplasme de l'amibe.

(5.32) Modèle à deux phases de diffusion de l'oxydase dans un tissu hétérogène qui respire.

(5.321) Modèles précédents :

HILL (1929), KEYNES (1954) et Mac LENNAN (1956) ont imaginé des modèles de diffusion de substances dans un tissu hétérogène qui tiennent compte

de deux phases intra et extra-cellulaire. Mais les substances diffusantes ne réagissent pas chimiquement à l'intérieur de la cellule.

WARBURG (1923) traite la diffusion de l'oxygène dans une tranche de tissu supposé homogène et trouve ainsi une expression :

$$C_1 = Co - \frac{A}{D}\frac{d^2}{8} \qquad (5.31)$$

ou C_1 est la concentration d'oxygène au centre de la tranche, Co celle du milieu extérieur, A la vitesse de respiration des cellules et d l'épaisseur de la tranche Si on prend pour valeur particulière de C_1 la concentration critique pour la tranche C_s, celle-ci est alors proportionnelle à une constante près, au carré de l'épaisseur de la tranche (relation parabolique). Cette relation n'est pas en général vérifiée expérimentalement.

A ma connaissance, le seul modèle qui traite de la diffusion de l'oxygène dans un tissu qui respire en tenant compte de deux phases est celui de HILL (1970). Il est fondé sur l'hypothèse suivante : si dans un tissu la diffusion extra-cellulaire D_1 est plus rapide que la diffusion intra-cellulaire D_2, la concentration au centre de la tranche ($z = h$) doit être supérieure ou égale à la concentration critique de la cellule C_r pour maintenir une respiration maximum. Soit pour une épaisseur 2 h.

$$C_1 \Big|_{z=h} \geqslant C_r \qquad (5.32)$$

C_1 étant la valeur de la concentration dans la phase extra-cellulaire.

Le résultat du calcul de HILL s'exprime dans le cas où C_1 est égal à la concentration critique de la tranche.

$$(5.33) \qquad C_s = \alpha \frac{h^2}{2} + C_r$$

avec

$$C_s = \frac{\beta Q}{(1-\beta) D_1}$$

$$\beta = \frac{v}{V} = \frac{\text{volume des cellules}}{\text{Volume total}}$$

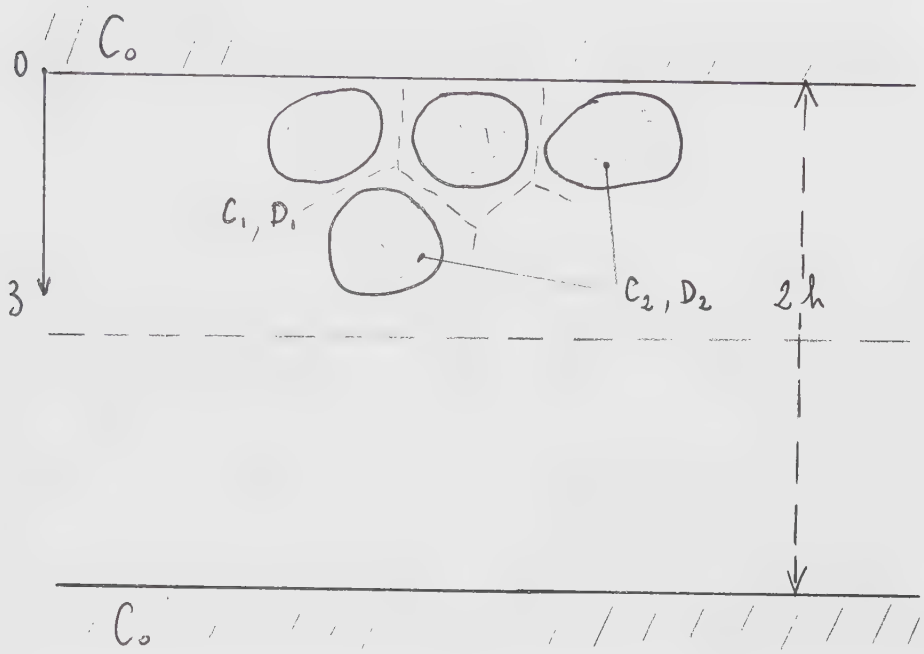
Q = consommation d'oxygène par unité de volume cellulaire.

L'application de cette formule à nos données expérimentales conduit à des résultats aberrants : de même que dans le modèle à une phase de WARBURG, la concentration critique pour ce tissu varie comme le carré de l'épaisseur, (pour des vitesses de respiration identiques), et cela n'est pas confirmé par les résultats expérimentaux.

5.322 Modèle à deux phases pour la diffusion de l'oxygène dans un tissu qui respire :

Nous envisageons le cas d'un tissu sans zone d'anaérobiose : toutes les cellules sont alimentées en oxygène. Si dans un tissu la diffusion extra-cellulaire (D_1) est plus rapide que la diffusion intra-cellulaire (D_2), la concentration au centre de la

couche doit être supérieure ou égale à la concentration critique de la cellule C_r pour maintenir une respiration maximum.



Soit pour une épaisseur 2 h :

$$C_1 \Big|_{z=h} \geqslant C_r \qquad (5.34)$$

C_1 étant la valeur de la concentration en oxygène dans la phase extra-cellulaire. Quand il y a égalité entre les deux membres de (5.34), $C_1\Big|_{z=0}$)

correspond à la concentration critique pour la tranche de tissu, soit C_s.

Le problème étant complexe, il est inévitable de faire certaines approximations. La démarche de HILL (1970) a été de traiter les deux phases successivement, en calculant pour la phase extra-cellulaire une respiration équivalente, fonction de la concentration extra-cellulaire si

$$C_1 \gg C_r$$

Nous avons ici essayé de traiter les deux phases simultanément, ce qui conserve leur particularité physique : le fait qu'elle soit ou non absorbante pour l'oxygène. Considérant que l'on peut assimiler la tranche mince de tissu à deux plans parallèles en x et y, les équations qui traduisent la diffusion de l'oxygène s'écrivent dans les conditions de l'état stationnaire :

- Dans la phase inter-cellulaire (D_1, C_1) :

$$\nabla^2 C_1 = 0$$

Soit en moyenne dans l'espace inter-cellulaire du plan z = constante:

$$\frac{d^2 C_1}{dz^2} = 0 \qquad (5.35)$$

- A l'intérieur des cellules (D_2, C_2) :

$$\frac{1}{r}\frac{d^2}{dr^2}(C_2\, r) + \frac{1}{r^2 \sin\theta}\frac{d}{d\theta}\left(\sin\frac{dC_2}{d\theta}\right) = \frac{Q}{D_2} \qquad (5.36)$$

Q étant la consommation d'oxygène par unité de volume cellulaire.
r la distance au centre d'une cellule.
θ l'angle que forme l'axe des z avec le rayon passant par le point considéré.

Ces équations admettent pour conditions aux limites :

(5.37) $\left| \begin{array}{l} z = 0 \\ C_1 = Co \end{array} \right.$

Co est la concentration en oxygène dans le milieu extérieur à la tranche (ce milieu étant fortement agité, on considère que le coefficient de diffusion est infini et par conséquent Co est la même dans tout le milieu).

(5.38) $\left| \begin{array}{l} r = R \\ C_1 = C_2 \end{array} \right.$ R = rayon moyen d'une cellule.

(5.39) $\left. \frac{dC_2}{dr} \right|_{r = 0} = 0$

et à la limite de séparation entre les deux phases du tissu :

(5.310) $$D_1 \frac{\partial C_1}{\partial n_1} = D_2 \frac{\partial C_2}{\partial n_2}$$

les solutions de (5.35) et (5.36) s'écrivent :

(5.311) $$C_1 = Co + A_1 z$$

$$(5.312) \qquad C_2 = A_2 r \cdot \cos\theta + \frac{Qr^2}{6 D_2} + B_2$$

La condition (5. 38) implique :

$$(5.313) \qquad A_1 = A_2$$

$$(5.314) \qquad B_2 = Co \cdot \frac{Q R^2}{6 D_2}$$

Dans le cas où la concentration critique C_r pour une cellule isolée, est due à la diffusion de l'oxygène, elle s'écrit :

$$(5.315) \qquad C_r = \frac{Q R^2}{6 D_2}$$

et par conséquent :

$$(5.316) \qquad B_2 = Co - C_r \qquad \text{toujours} > 0$$

C_2 a donc une valeur finie quel que soit r.

Considérons le flux d'oxygène dans l'espace inter-cellulaire :

$$\vec{\varphi} = - D \ \overrightarrow{\text{grad.}}\ C$$

Bien que globalement la diffusion de l'oxygène dans la tranche se fasse dans une direction privilégiée Oz, dans l'espace inter-cellulaire, à cause de la disposition des cellules, le cheminement de l'oxygène n'est pas rectiligne, et cela pourrait

s'exprimer en disant que le flux d'oxygène a deux composantes (si on considére le demi-espace extra-cellulaire bordant une cellule) :

- Une composante tangentielle φ_T qui correspondrait à l'oxygène qui circule entre les cellules sans être absorbé : c'est l'équivalent qu'une quantité d'oxygène qui circulerait globalement dans la direction Oz avec un chemin de diffusion plus long.

- Une composante normale φ_N, qui correspondrait à l'oxygène absorbé par la cellule, et cette composante est toujours orientée vers l'intérieur de la cellule si $C_2 \geqslant C_r$

Dans ces conditions, la condition aux limites (5.310) :

$$D_1 \frac{\partial C_1}{\partial n_1} = D_2 \frac{\partial C_2}{\partial n_2}$$

s'explicite :

$$(5.317) \qquad D_1 \frac{\partial C_1}{\partial n_1} = D_1 A_1 \left|\cos \theta\right|, \text{normale interne}$$

et l'autre terme :

$$(5.318) \qquad D_2 \frac{C_2}{n_2} + A_2 D_2 \cos \theta + D_2 \frac{Q}{3 D_2} r \Bigg|_{r = R}$$

Considérons que dans un plan z, le nombre de cellules est extrèmement élevé (environ 26 000 par rondelle de tissu dans nos expériences), on peut attribuer aux expressions (5.317) et (5.318) une valeur moyenne (en faisant varier θ de $-\pi$ à 0) et (5.310) s'écrit :

$$(5.319) \qquad -\frac{2}{\pi} D_1 A_1 = \frac{Q}{3} R$$

soit :

$$(5.320) \qquad A_1 = -\frac{\pi}{6} \frac{QR}{D_1}$$

La concentration dans l'espace extra-cellulaire peut alors s'exprimer en fonction de la profondeur de la couche de tissu, pourvu que celui-ci soit sans zone d'anaérobiose :

$$(5.321) \qquad C_1 = -\alpha \frac{QR}{D_1} z + Co$$

α est un facteur numérique (positif) fonction de l'augmentation du chemin de diffusion, du rapport des volumes... c'est-à-dire des particularités spatiales du système.

Un exemple de calcul d'augmentation du chemin de diffusion pour un fluide rencontrant des obstacles sphériques est donné par Mac LENNAN (1956) : le coefficient de diffusion est affecté d'un facteur de l'ordre de 1,5.

Pour un tissu, ce qui est accessible expérimentalement, c'est la concentration critique de la tranche, soit :

$$C_s = C_1 \Big|_{z = 0}$$

correspondant à :

$$C_1 \Big|_{z = h} = C_r$$

Son expression en fonction de l'épaisseur limite h qui permet une respiration maximum est, en fonction de (5.321).

$$C_s = \alpha \frac{QR}{D_1} h + C_r \tag{5.322}$$

Remarquons que cette expression est valable quelles que soient les valeurs respectives de D_1 et D_2, pourvu que l'on ait :

$$C_1 \gg C_r$$

Pour une vitesse de respiration donnée Q, C_s varie linéairement avec h.

Si l'oxydase terminale a une grande affinité pour l'oxygène, C_r dépend uniquement de la diffusion de l'oxygène dans la cellule et l'expression déjà citée (5.315) est :

$$C_r = \frac{QR^2}{6\ D_2}$$

ce qui permet d'exprimer la variation relative de concentration entre le bord et le milieu de la tranche de tissu :

$$\frac{\Delta C}{C_r} = \frac{C_s - C_r}{C_r} = A \frac{D_2}{D_1} h \tag{5.323}$$

A étant une constante. Cette expression est d'autant plus faible que D_1 est plus grand que D_2.

Dans nos expériences, pendant les premières heures après la coupe, la vitesse de respiration est identique dans les tranches de 1 et 2,5 mm et nous trouvons une concentration critique du même ordre dans les deux cas :

Pour e = 1 mm V = 7 μM/h g.p.s. $C_s = 55 \pm 5\ \mu M/l.$
Pour e = 2,5 mm V = 6,8 μM/h/g.p.s. $C_s = 55 \pm 5\ \mu M/l.$

Ce qui signifie $C_s \neq C_r$

La diffusion extra-cellulaire joue peu.

5.323 Application de ce modèle aux données de LONGMUIR et BOURKE (1960) :

Nous avons essayé d'interpréter les résultats obtenus par LONGMUIR et BOURKE (1960) sur des tissus de coeur et de foie de rat pour lesquels on a des variations assez importantes de C_s en testant la relation (5.322). Deux cas peuvent être envisagés :

1- C_r est une constante pour les cellules, quelle que soit Q, ce qui signifie que la concentration critique cellulaire est due selon LONGMUIR et BOURKE à l'oxydase terminale (faible affinité pour l'oxygène) ; ou bien on peut imaginer que la densité volumique des mitochondries est plus importante dans les cellules de plus faible diamètre...

Dans ce cas la relation (5.322) peut s'écrire :

(5.324) $C_s = C_r + \delta (Q_m.h)$, linéaire par rapport

à $(Q_m.h)$.

Mais alors il n'est pas légitime d'appliquer la régression linéaire empirique utilisée par LONGMUIR et BOURKE :

$$d^2 = 8\ D\ \frac{(C_s)}{(Q)} - 8\ D\ \frac{(C_c)}{(Q)}$$

soit :

$$(5.325) \qquad d^2 = a\ \left(\frac{C_s}{Q}\right) - b$$

où (C_c/Q) est considéré comme une constante alors que les mesures indiquent Q variable.

2- C_r est dû à la diffusion de l'oxygène et s'exprime par la relation (5.315) soit pour (5.322) :

$$C_s = \gamma\ Q_m + \delta\ Q_m h$$

γ et δ sont des constantes et il doit exister une relation linéaire entre C_s/Q_m et h.

$$(5.326) \qquad \frac{C_s}{Q_m} = \gamma + \delta\ h$$

Nous avons appliqué les régressions (5.324, 5.325, 5.326) aux trois séries de données (p. 227 de l'article de LONGMUIR).

Dans tous les cas la régression (5.325) est la plus mauvaise car la dispersion des points par rapport à la droite de régression n'est pas aléatoire.

Les séries 2 et 3 satisfont indifféremment les deux régressions (5.326) et (5.324) mais la série 1

(tranches de foie de rat) n'est en accord qu'avec la régression linéaire (5.326). (Graphiques 22, 23, 24) ce qui permet de faire une discrimination entre les deux interprétations.

- Le modèle à deux phases proposé, où C_r est dû à la diffusion intra-cellulaire, constitue donc une assez bonne approximation. Il permet d'interpréter les résultats sans faire d'hypothèses supplémentaires.

Ce modèle dont l'intérêt est de conduire à une expression analytique de la concentration en fonction de l'épaisseur, est cependant une approximation de la réalité, en ce sens que le gradient de concentration entre les cellules n'est vraisemblablement pas strictement linéaire.

Un autre moyen de traiter le problème de la diffusion de l'oxygène dans un réseau de cellules qui respirent serait peut-être de le résoudre par analogie avec l'électrostatique.

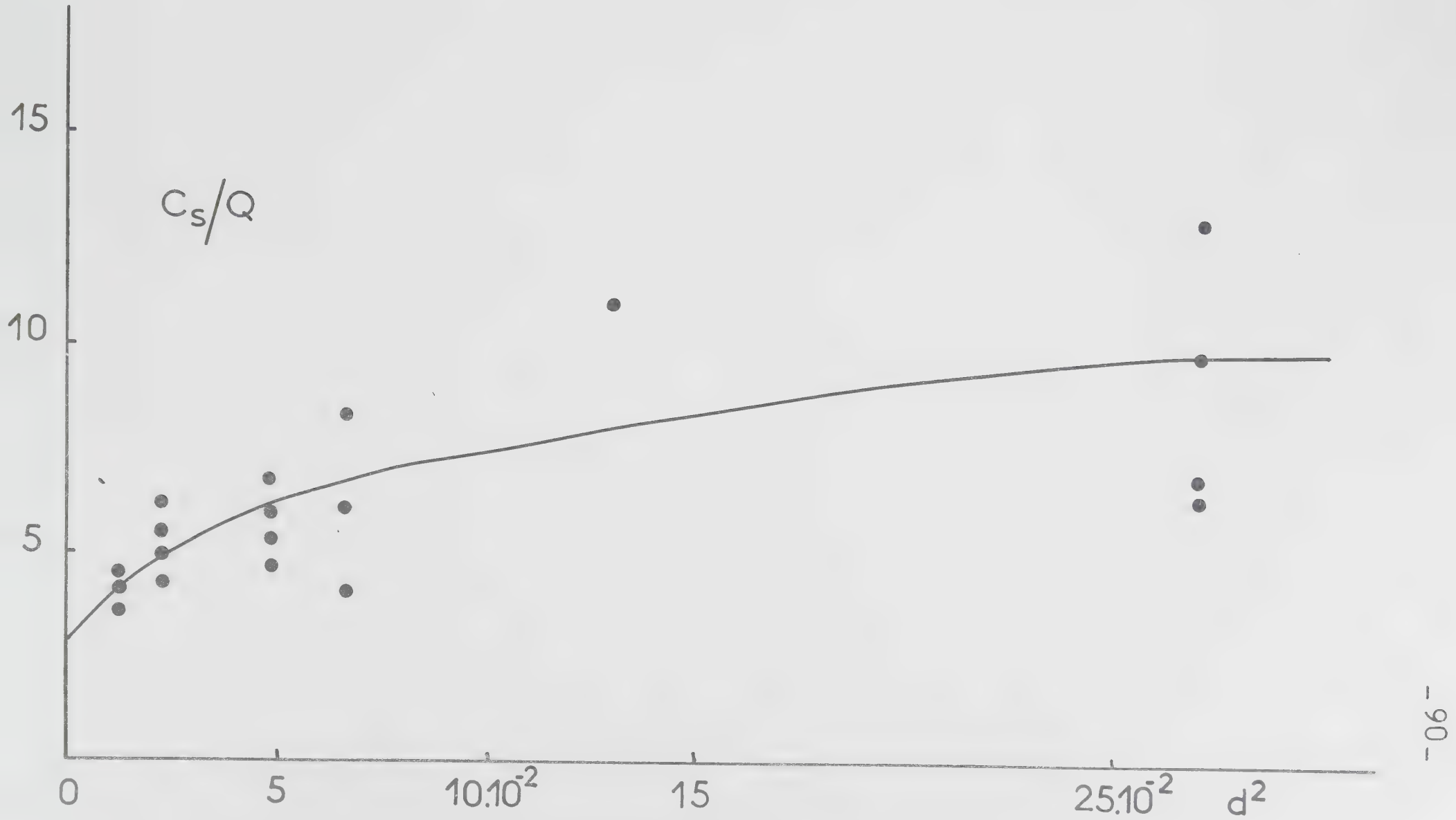

15
10
5
C_s/Q
0
5
10.10^{-2}
15
25.10^{-2}
d^2

Fig. 22 - Regression (5.324) : $C_s/Q = f(h^2)$ d'après les données de LONGMUIR et BOURKE (1960) sur des tranches de foie de rat. Allure parabolique de la courbe.

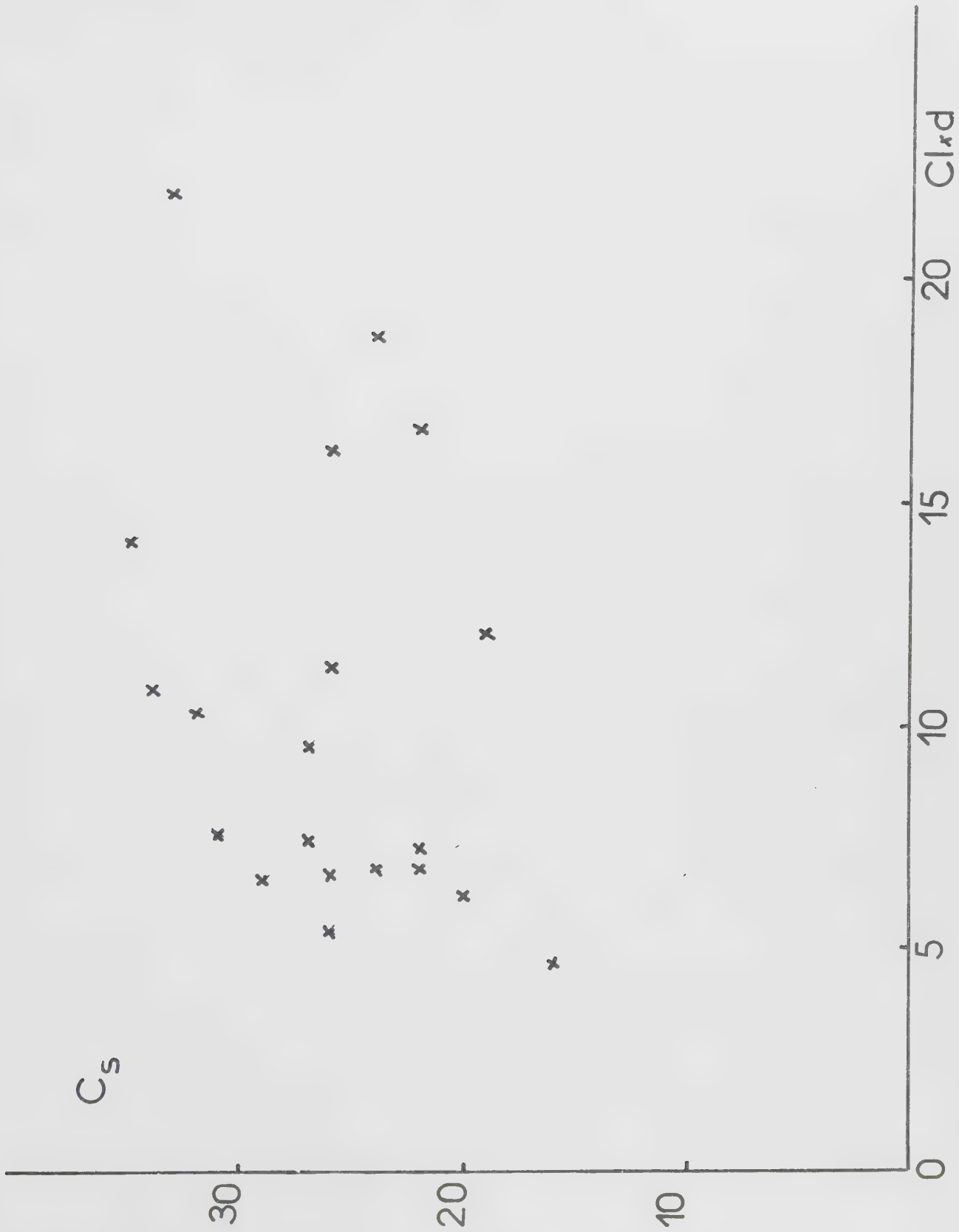

C_s
30
20
10
0
5
10
15
20
Cl.d

Fig. 23 - Regression (5.324) : $Cs = C_r + \delta Q_m h$, d'après les données de LONGMUIR et BOURKE (1960) sur les tranches de foie de rat.

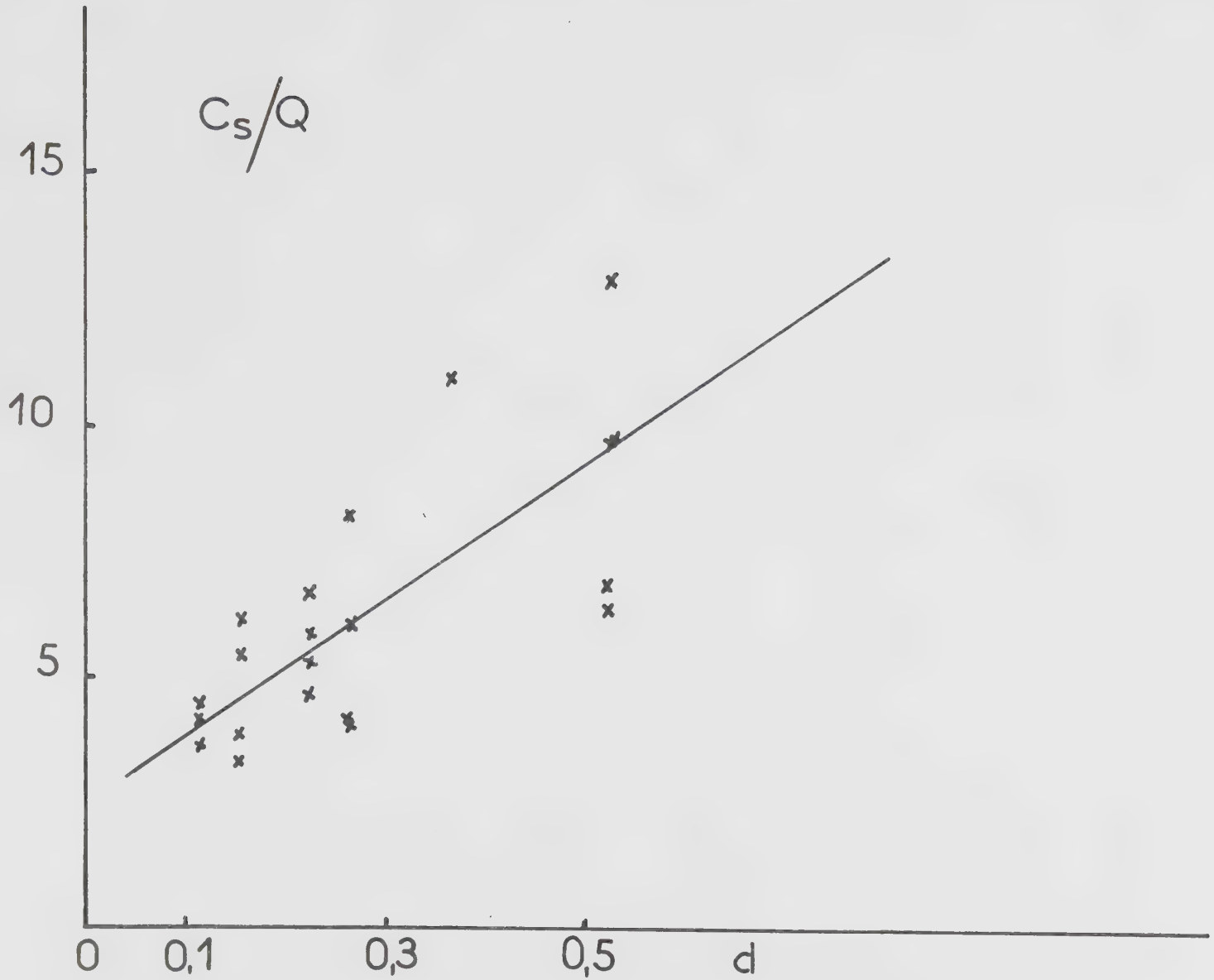

C_s/Q
15
10
5
0
0,1
0,3
0,5
d

Fig. 24 - Regréssion (5.326) : $Cs/Q_m = \gamma + \delta h$
d'après les données de LONGMUIR et BOURKE
concernant les tranches de foie de rat.

CHAPITRE VI

CONFRONTATION AVEC D'AUTRES MODELES.

6.1 Modèles proposés par SCHINDLER (thèse 1964).

SCHINDLER propose deux formalismes et en fait l'analyse, pour déterminer dans quelles conditions ils peuvent tenir compte des faits suivants :

- Dans une représentation de Log $(V/(R_m-V))$ en fonction de Log V, la pente est de 1.4 (résultats de BAENDER et KIESE et de LONGMUIR (1957)).

- L'enzyme terminal n'est pas complètement oxydé, alors même que la vitesse maximum de respiration (expérimentale) est atteinte.

Ces modèles font intervenir soit deux enzymes en chaîne (schéma M), soit deux particules liées (schéma P).

* Schéma M.

Il s'apparente aux modèles d'enzymes en chaîne étudiés par HIGGINS (1959), et se fonde sur la loi d'action de masse :

(6.1)

$$E_1 + S \xrightarrow{k_1} E_1 S$$

$$E_1 S + E_2 \xrightarrow{k_2} E_2 S + E_1$$

$$E_2 S \xrightarrow{k_3} E_2 + P$$

Le degré de la caractéristique qui exprime la variation de la vitesse (V) en fonction de la concentration en substrat (X) dépend du nombre d'enzymes impliqués. SCHINDLER utilise dans l'état stationnaire des coordonnées réduites :

(6.2) $$X' = \frac{k_1 \, eX}{R_m}$$

(6.3) $$r = \frac{R_m}{k_3 \, e} = \text{degré d'oxydation}$$

avec

$e_1 = e_2 = e$, concentration en enzyme,

pour exprimer cette caractéristique :

(6.4) $$V + A_1 \frac{V}{X} - A_2 \frac{V^2}{X} = A_3 \qquad (A_i, \text{ constantes})$$

soit :

(6.5) $$\frac{R_m}{V} = 1 + \frac{1}{X'} - \frac{r}{1 + X'} - \frac{r^2 \, X'}{(1 + X')^3} - \ldots$$

* Schéma P :

Chaque enzyme auto-oxydable est lié en permanence à un cytochrome e_2.

(6.6)

$$
\begin{cases}
e_1\ e_2 + S \xrightarrow{k_1} e'_1\ e_2 \\
e_1\ e'_2 + S \xrightarrow{k_1} e'_1\ e'_2 \\
e'_1\ e_2 \xrightarrow{k_2} e_1\ e'_2 \\
e_1\ e'_2 \xrightarrow{k_3} e_1\ e_2 \\
e'_1\ e'_2 \xrightarrow{k_3} e'_1\ e_2
\end{cases}
$$

La caractéristique est alors :

(6.7)

$$\frac{R_m}{V} = 1 + \frac{1}{X'} - \frac{r}{1 + r\,X'}$$

identique à celle d'un enzyme simple si :

$$r \longrightarrow 0$$

* Confrontation des deux modèles aux faits expérimentaux :

Notons d'abord que si r est assez différent de zéro, une quelconque représentation en (1/V, 1/S) donnerait une déviation par rapport à une droite.

6.11 Pente 1.4 de BAENDER et KIESE :

Cette pente apparait dans la représentation Log $(V/(R_m - V))$ en fonction de Log X, au voisinage de $R_m/2$, dans les conditions suivantes :

- Schéma M : r = 0,7 soit 70 % d'oxydation
- Schéma P : r = 1 c'est alors contraire au fait que le cytochrome n'est pas totalement oxydé quand $V = R_m$.

6.12 Cinétique aux très faibles concentrations d'oxygène :

Un résultat très intéressant trouvé par SCHINDLER est que la cinétique est strictement du premier ordre pour X très faible, avec des mitochondries, de la cytochrome oxydase purifiée et des levures. C'est en accord avec les résultats plus récents de CHANCE et PRING (1969) sur la cytochrome oxydase extraite de coeur de pigeon :

$$\frac{d}{dt}\left[O_2\right] = V = k_1 \left[\text{heme a}\right] \cdot \left[O_2\right] \tag{6.8}$$

Si X est petit, les deux caractéristiques deviennent :

* Pour le schéma P :

$$\frac{1}{V} = \frac{1 - r}{R_m} + \frac{1}{R_1\, eX} \tag{6.9}$$

si le nombre de particules croît le système devient indistinguable de celui à un seul enzyme.

* Pour le schéma M :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{R_m} + \frac{1}{k_1\, ex} \tag{6.10}$$

Si le nombre d'enzymes est supérieur à deux, il est impossible de tirer une relation du même type aux faibles concentrations de substrat.

Si X est très petit, le schéma M est comparable avec les résultats exprimés par la relation (6.8).

(6.11) $$V \# k_1 . e . X$$

comme c'est d'ailleurs le cas pour un enzyme simple.

Le schéma P donnerait une forme quelque peu semblable, mais la constante du deuxième ordre ne serait plus égale à k_1.

(6.12) $$V \# (1 - r)\, k_1 . e . X$$

Ce n'est pas discernable expérimentablement.

6.13 Comportement en présence d'oxyde de carbone :

Les paramètres deviennent :

(6.13) $$r^{CO} = r$$

(6.14) $$X'^{CO} = X'/(1 + CO/K_{CO})$$

* Schéma P :

En présence d'oxyde de carbone, la caractéristique devient :

(6.15) $$\frac{R_m}{V} = 1 + \frac{1}{X'^{CO}} - \frac{r}{1 + r\, X'^{CO} (1 + CO/K_{CO})}$$

La forme varie suivant la concentration en CO et r.

Si : $X' \gg 1$

et : $CO \gg K_{co}$

(6.16) $$\frac{R_m}{V} \longrightarrow 1 + \frac{1}{X'^{co}}$$

identique à un système à un seul enzyme, quel que soit r. Dans la terminologie de SCHINDLER, R_m désigne une vitesse maximum expérimentale. En fait quand $r \neq 1$, la vitesse qui se déduit de la transformation en $1/V$, $1/X'_{co}$, n'est pas égale à la vitesse maximum expérimentale (V et X' étant alors des valeurs expérimentales).

* Schéma M :

Pour ce mécanisme, la caractéristique en R_m/V est la même en présence d'oxyde de carbone et d'air, si on remplace X' par X'^{co}.

Notons que c'est la même chose pour un système à un seul enzyme. Seules les formes des caractéristiques peuvent distinguer entre les deux systèmes.

6.14 Choix de SCHINDLER et analyse de la démonstration de WINZLER :

A cause du comportement des systèmes ou l'on sait $r \neq 1$, le schéma P est éliminé. SCHINDLER justifie l'utilisation du shéma M à l'aide des résultats

expérimentaux de WINZLER (1941) avec l'oxyde de carbone. Il faut de plus r = 0,7 pour tenir compte du point (6.11), ce qui est très plausible.

Pour montrer que la limitation de la respiration des levures aux faibles tensions d'oxygène est due à un phénomène enzymatique et non à une limitation par la diffusion, WINZLER fait la transformation :

$$X'^{CO} \longrightarrow X'$$

en divisant les abcisses des données obtenues avec CO par $(1 + CO/K_{co})$. Il faut connaître K_{co}.

Les courbes en présence d'oxyde de carbone vérifient l'équation de WARBURG :

$$(6.17) \qquad K = \frac{\varepsilon n}{1 - \varepsilon n} \frac{Co}{O_2}$$

ε = terme de "saturation en substrat"

$n = V/R_m$

et permettent le calcul de :

$$(6.18) \qquad K = \frac{K_{co}}{K_m} = 2.25$$

Le K_{co} nécessaire à la transformation est alors calculé :

$$(6.19) \qquad K_{co} = 2.25\ K_m$$

en déduisant le "K_m" de la courbe expérimentale dans l'air.

Remarquons d'abord que la courbe (V, C)

dans l'air n'est pas parfaitement hyperbolique (tout comme dans le cas de disques de pommes de terre) : la transformation (1/V, 1/C) est linéaire d'après WINZLER, en dessous de 70 % d'oxygène (elle ne l'est donc plus dans la zone de meilleure précision expérimentale).

En outre, le K_m de la relation (6.19) est le paramètre de la réaction cytochrome-oxydase-oxygène, qui n'est pas directement mesuré dans cette expérience.

Déduire "K_m", de la courbe expérimentale, consiste à appliquer aux points expérimentaux l'hyperbole la plus proche, et à attribuer à la réaction dite enzymatique (qui est supposée être la réaction cytochrome oxydase-oxygène) le paramètre de cette hyperbole : cela revient à faire pour cette courbe obtenue en présence d'air avec des cellules entières l'hypothèse d'un phénomène enzymatique, qui est ce que l'on est censé démontrer. Que les courbes dans l'air et l'oxyde de carbone se déduisent ensuite l'une de l'autre dans la transformation ($X' \xrightarrow{CO} X'$) est une condition nécessaire, mais non suffisante pour que le phénomène soit de nature enzymatique.

Par ailleurs, WINZLER cite de nombreux arguments en faveur de la limitation de la respiration par la diffusion intra-cellulaire de l'oxygène (notamment la constance du coefficient apparent de diffusion calculé, ce que nous avons également constaté avec les cellules de pommes de terre), mais ces arguments sont rejetés en faveur de la "démonstration" ci- dessus.

6.14 Compatibilité du schéma M retenu avec les faits connus :

Le schéma M de SCHINDLER implique une même forme de la caractéristique dans l'air et dans l'oxyde de carbone, et cette caractéristique en (1/V, 1/C) n'est pas linéaire (formule (2.35)).

Or, si dans l'air, les résultats de WINZLER indiquent une forme approximativement linéaire seulement au-dessous de 70 % de la vitesse maximum expérimentale, et les mesures de MOIROUD (thèse, 1963) une relation non linéaire, nos mesures sur les levures en présence d'oxyde de carbone, se traduisent parfaitement par une droite dans toute la gamme de concentrations étudiées,(dans le formalisme (1/V, 1/C) ou (V, V/C) (Fig. 16).

C'est encore plus net avec un matériel comme les cellules de pomme de terre (Fig; 9 et 10).

Par contre, au niveau des mitochondries, les données de BAENDER et KIESE se transforment en droite dans les coordonnées (1/V, 1/C) (Fig. 19) :

La forme de la caractéristique est donc la même pour les mitochondries dans l'air et les cellules dans l'oxyde de carbone. De plus elle est linéaire , ce qui est incompatible avec la formule (6.5) donnée pour le système d'enzyme en chaîne. Il ne semble donc pas que le schéma M puisse rendre compte de tous les faits expérimentaux, ce qui peut se résumer par :

$$CE \rightleftharpoons M \xrightarrow{T} M' \not\longrightarrow CE$$

Notons que pour les levures, le rapport V_m/R_m est différent selon les souches étudiées, et il s'étage de 0,5 à 1. Ceci explique sans doute que SCHINDLER ait obtenu avec des levures des résultats qu'il indique proches d'un système à un seul enzyme (dans son formalisme, r = 1), dans la zone allant du premier ordre par rapport à C à l'ordre zéro.

(6.15) Identité du schéma M et du cas VII de LINEWEAVER et BURK (1934) :

Ainsi que le fait remarquer SCHINDLER, le schéma M est identique au cas de LINEWEAVER-BURK ainsi formulé :

(6.19)
$$\begin{cases} S \xrightarrow{k'_1} S' \text{ (steady-state)} \\ S' + E \rightleftharpoons ES \text{ (active)} \end{cases}$$

La réaction $S \longrightarrow S'$ étant de nature soit physique (diffusion passive), soit chimique. L'auteur précise que c'est le cas de nombreux enzymes intra-cellulaires, "spécialement quand la vitesse de diffusion, comme dans les tissus devient limitante".

L'équation implicite de la vitesse est décrite :

(6.20) $$V = R_m\, k'_1\, (S)/(R_m + k'_1\, K + k'_1\, (S) - V)$$

De même que pour le schéma M, ou le cas d'un enzyme simple, nous retrouvons aux faibles concentrations en substrat une cinétique du premier ordre : la pente de la droite en (1/V, 1/C) est alors K_m/R_m.

6.2 Modèles de "diffusion facilitée".

De nombreux travaux ont été effectués ces dernières années concernant la diffusion de l'oxygène dans les tissus animaux, qui peuvent se regrouper autour du concept de "diffusion facilitée". Ils ont ceci en commun qu'étant admis que la consommation de l'oxygène a lieu par une réaction d'ordre zéro, la possibilité d'un transport non passif à travers le tissu est envisagé.

WITTENBERG (1959) propose la myoglobine comme transporteur d'oxygène dans le tissu. Ceci a été repris par divers auteurs en ce qui concerne l'hémoglobine et la myoglobine (en particulier KREUZER, 1970, KREUZER et HOFFD 1970). Selon KREUZER, "l'importance physiologique de la diffusion facilitée de l'oxygène par l'hémoglobine et la myoglobine reste à un niveau spéculatif, tant que les conditions physiologiques exactes restent inconnues et en l'absence de faits expérimentaux déterminants".

LONGMUIR (1966, 1971) fait aussi l'hypothèse d'un transporteur d'oxygène autre que la myoglobine dans les tissus qui ne possèdent pas ce pigment.

Ce qui n'apparait pas clairement à travers les faits rapportés, c'est la localisation de ce transporteur :

- Il serait dans la phase extra-cellulaire si l'on tient compte de la différence observée entre les concentrations d'oxygène correspondant à la demi-vitesse maximum des cellules de foie isolées et des tranches (3.0 mm O_2 pour les cellules, 100 mm O_2 pour les tranches, LONGMUIR 1966 p. 305) ; alors qu'on

observe peu de différence entre les cellules et les mitochondries des mêmes organismes (2.8 mm O_2) pour ces dernières).

- Il serait à l'intérieur de la cellule si l'on accepte l'hypothèse d'un pigment P 450 fixé sur les microsomes jouant ce rôle (LONGMUIR, MARTIN, GOLD et SUN 1971, LONGMUIR 1971).

La démarche suivie a été de confronter la variation de la concentration en oxygène à deux modèles :

- Un modèle de <u>diffusion facilitée</u> sélectionné en fonction de :

$$CE \rightleftharpoons M_1$$

avec M_1 de type enzymatique. En effet, si on suppose que la diffusion de l'oxygène est accélérée par un transporteur qui peut être soit de type "site fixe", soit de type "mobile", la relation entre V et C peut se traduire dans les deux cas par une formule hyperbolique de type :

$$V = \frac{V_m \, C}{K_m + C}$$

mais la dépendance vis à vis de la concentration en transporteur varie (GOLD 1969). Le choix entre les deux types de transporteurs se fait par l'intermédiaire d'expériences de vieillissement (ageing), qui sont censées avoir pour effet de diminuer la concentration des dits transporteurs (LONGMUIR 1971).

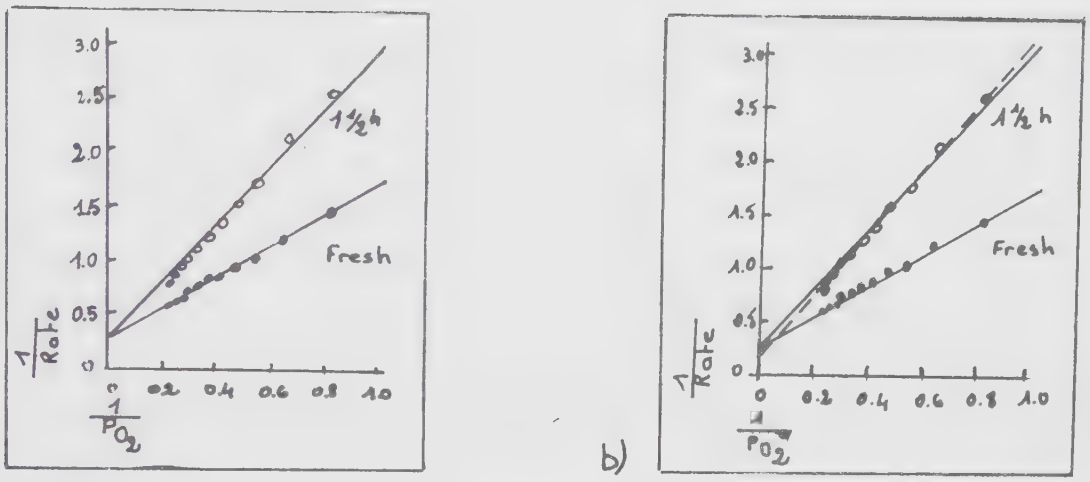


Fig. 25 - Respiration de tranches de foie en fonction de la concentration en oxygène (pO_2). Effet de la survie.

a) Reproduction de la Fig. 1 de LONGMUIR (1971)

b) La droite en pointillés nous parait mieux correspondre aux points indiqués, et indiquerait une vitesse plus grande que pour les tranches fraîches.

Si le transporteur est mobile, sa perte devrait entraîner une diminution de la vitesse maximum sans changement pour K_m. S'il est fixe, K_m croît sans que V_m soit affecté : c'est ce que LONGMUIR trouve expérimentalement au bout d'une heure et demi de vieillissement en traçant une représentation des données en (1/V, 1/C). Il semblerait cependant, d'après la figure 1 donnée par l'auteur et reproduite ici (Fig. 25) que, de même que pour la survie chez les végétaux, le V_m ait augmenté parallèlement au K_m.

- Un modèle de <u>diffusion passive</u> est rejeté, pour non concordance avec les mesures expérimentales

$$CE \rightleftharpoons M_2$$

et c'est le modèle classique de diffusion de l'oxygène dans un tissu supposé <u>homogène</u>, pour lequel

$$V = 2\,A\,Q\,\sqrt{\frac{2\,D\,C}{Q}}$$

où A = surface de la tranche, Q respiration par unité de volume et D coefficient de diffusion dans le tissu en unité de KROGH.

Que ce modèle ne rende pas compte de la réalité expérimentale n'implique pas forcément que le <u>concept</u> de diffusion passive soit rejeté (comme l'indique LONGMUIR 1970), mais il peut signifier qu'une des hypothèses (type H_j) sur lequel il se fonde est inadéquate, par exemple celle qui suppose le <u>tissu homogène.</u> Il est intéressant de voir par contre que pour une <u>tranche artificielle,</u> comme celles utilisées par LONGMUIR et SUN (1970), la relation

$$C_s = f(h^2)$$

est vérifiée, conformément à un modèle de diffusion passive dans un tissu homogène : il s'agit ici de préparation de muscle de coeur enrobée dans une solution d'agar.

Si on ne fait pas l'hypothèse d'un tissu parfaitement homogène, nous avons vu au chapitre V (§ 5.322) qu'un modèle à deux phases de diffusion de l'oxygène pouvait rendre compte des résultats expérimentaux concernant la relation entre la concentration critique de la cellule, celle de la tranche et l'épaisseur de celle-ci. Il suppose simplement que l'oxygène n'est pas consommé dans l'espace intercellulaire, et que la concentration critique de la cellule est proportionnelle à la vitesse maximale de respiration des cellules :

$$C_r \# \propto V_m$$

ce qui est une relation expérimentalement vérifiée aussi bien avec des cellules de Pomme de terre qu'avec des cellules isolées de foie (LONGMUIR 1957).

En conclusion, s'il semble plausible que des pigments comme l'hémoglobine et la myoglobine puissent faciliter le transport de l'oxygène, en ce sens que l'on peut trouver un modèle tel que :

$$CE \rightleftarrows M$$

en ce qui concerne d'autre transporteurs, cela semble une hypothèse moins convainquante.

Si effectivement le K_m des mitochondries et

celui des cellules isolées de foie sont du même ordre de grandeur, (LONGMUIR 1966), il est possible que diffusion et cinétique enzymatique interfèrent dans ces cellules de petites tailles. De toute manière cette étude nécessite de séparer les paramètres (transport dans le tissu, dans la cellule, survie) et de trouver les situations expérimentales qui permettent de tester les modèles envisagés.

6.3 Modèle postulant une oxydase supplémentaire à faible affinité pour l'oxygène.

Les résultats de MAPSON et BURTON, (1952) concernant la respiration du tubercule de pomme de terre, peuvent, ainsi que l'on montré ces auteurs, s'interpréter comme la résultante de l'action des deux oxydases terminales. L'analyse des courbes en $(1/V, 1/C)$, en supposant qu'une des oxydases au moins a une affinité très grande pour l'oxygène, permet de déduire pour ces enzymes dont chaque contribution à la respiration totale est évaluée à 50 %, des constantes "K_m" :

$$K_1 = 4.10^{-7} \text{ M}$$
$$K_2 = 1,5.10^{-4} \text{ M}$$

K_1 est supposée correspondre à la cytochrome oxydase bien que cette valeur soit un peu plus grande que celle habituellement trouvée pour cet enzyme.

Il y a bien là un modèle possible pour lequel :

$$CE \rightleftharpoons M$$

On peut le rapprocher d'une hypothèse couramment proposée pour expliquer l'insensibilité pro-

gressive des tranches minces de pommes de terre aux inhibiteurs, au cours de la survie : c'est qu'il existe deux oxydases dont une seule est sensible à l'oxyde de carbone ou au cyanure (cytochrome oxydase).

Il serait plausible de supposer qu'il s'agit des mêmes oxydases mises en évidence par MAPSON et BURTON, et qui seraient plus ou moins fonctionnelles selon les conditions expérimentales.

Que devient ce modèle si on lui applique la transformation T ? (inhibition par CO).

Supposons que cette deuxième oxydase intervienne dès les premières heures de survie, puisque expérimentalement, on observe des écarts par rapport à une représentation en coordonnées de LINEWEAVER-BURK pour un enzyme simple, avec des mélanges (CO,O_2) à proportion relativement faible d'oxyde de carbone (40 %). Cependant sa contribution ne semble pas alors pouvoir être supérieure à 10 % de la respiration totale, car la sensibilité aux inhibiteurs est très grande pendant cette période. La vitesse observée serait alors la somme de la respiration inhibée (passant par la cytochrome oxydase) et de celle due à la deuxième oxydase.

Les K_m apparents (K_1' (40), K_2' (80)) que l'on peut calculer pour les mélanges (CO,O_2) que nous avons fréquemment utilisés sont, sachant que K_{co} pour la cytochrome oxydase est de l'ordre de 4.10^{-7} M :

$$K_1' = K_1\left(1 + \frac{Co}{K_{co}}\right) \text{ soit :}$$

$K_1'(40) = 3,7.10^{-4}$ M avec 40 % de CO.

$K_2'(80) = 7,5.10^{-4}$ M avec 80 % de CO.

REINER (1959) a fait l'analyse de ces systèmes

à deux enzymes, et il donne l'expression des pentes initiales et finales dans la représentation en (1/V, 1/C), en fonction des affinités des enzymes pour le substrat et de leur contribution à la vitesse totale de la réaction. Il utilise un paramètre d (pourcentage par lequel K_1 excède K_2) tel que :

$$K_1 = K_2(1 + d)$$

Ici $K_2 = 1,5.10^{-4}$ M. d doit être au minimum égal à 1 pour distinguer entre les deux pentes et la déviation croît avec d. Ici, d = 2.7 pour 40 % et 6.5 pour 80% CO.

K_2/V étant un facteur commun aux pentes initiales et finales, le facteur multiplicatif qui permet éventuellement de distinguer ces pentes peut se calculer :

Pentes = (K_2/V) x facteur	d = 2.7 (40 % CO)	d = 6.5 (80 % CO)
$V_1 = 5\ V_2$		
facteur pente initiale	3.2	6.4
" " finale	2.55	3.6
$V_1 = 10\ V_2$		
facteur pente initiale	3.7	7.5
" " finale	2.94	4.7

Dans tous les cas, la différence entre les pentes initiales et finales est importante. Or expérimentalement, la représentation obtenue avec le mélange à 80 % d'oxyde de carbone est linéaire, identique à celle d'un enzyme simple.

Dans une représentation en (V, V/C) on peut exprimer d'une manière simple la pente de la courbe quand la concentration varie entre la concentration critique en présence de mélange (CO,O_2) et la concentration critique en l'absence d'inhibiteur.

$$V = -\frac{V}{C}\left(K_1 - \frac{V_2 K_1}{V}\right) + V_m$$

V_2K_1/V mesure l'écart par rapport à la droite de pente $-K_1$. Il croît quand la vitesse diminue, et est plus important pour les mélanges plus concentrés en oxyde de carbone ce qui n'est pas en accord avec nos résultats expérimentaux.

$$CE \rightleftharpoons M \longrightarrow T \not\longrightarrow CE$$

L'hypothèse d'une oxydase supplémentaire à faible affinité pour l'oxygène ne semble pas devoir convenir.

CONCLUSION

Nous avons cherché, à proposer un système d'explication cohérent, à l'activité respiratoire cellulaire observée aux faibles tensions d'oxygène, en essayant d'expliciter et de tester les hypothèses sur lesquelles se fonde ce système, et de montrer qu'il est compatible avec les faits expérimentaux connus jusqu'alors. Nous avons vu que cela ne nécessécitait pas d'hypothèse supplémentaire du type existence d'une deuxième oxydase terminale à faible affinité pour l'oxygène (MAPSON et BURTON, 1962).

Il nous apparait que la prédominance du rôle de la diffusion ou de l'activité enzymatique est fonction de la réaction avec l'enzyme (ou les enzymes), du domaine de concentration en substrat (oxygène), de la valeur du coefficient de diffusion D, et de la géométrie du système. Nous avons essayé de mettre en évidence diverses situations :

1° - La diffusion de l'oxygène est seule limitante : c'est le cas de la respiration de tranches de Pomme de terre dans l'air quand (O_2) décroît (d'environ 2.10^{-4} à 10^{-6} µM).

2° - La diffusion et la cinétique enzymatique sont en compétition : ce cas s'observe avec des cellules de Pomme de terre dont la respiration est faiblement inhibée par l'oxyde de carbone, pour des concentrations d'oxygène assez faibles. Il apparait plus facilement plusieurs heures après la coupe de tranches minces de Pomme de terre, (survie) car

l'inhibition, pour des tensions d'oxygène identiques décroît. C'est aussi vraisemblablement le cas des levures dans un mélange oxygène-azote aux faibles concentrations d'oxygène.

3° - La diffusion n'intervient pas pour limiter la vitesse de respiration : nous l'observons avec les levures quand la respiration est inhibée par l'oxyde de carbone ; avec les cellules de Pomme de terre pour des mélanges (CO, O_2) contenant une forte proportion d'oxyde de carbone, et pour les autres mélanges aux tensions d'oxygène assez élevées.

L'ensemble des faits énoncés est cohérent si l'on considère que :

- Une tranche de tissu n'est pas un milieu homogène, mais est constituée d'une phase extra-cellulaire et de cellules. Dans certains cas, la diffusion de l'oxygène dans l'espace extra-cellulaire a une influence négligeable (tranches minces, grosses cellules, comme dans le cas de la Pomme de terre, $De > Di$). Ce n'est pas apparemment le cas pour un matériel comme des tranches de foie.

- La réaction de la cytochrome oxydase avec l'oxygène se traduit, dans l'approximation de l'état stationnaire, par une cinétique du premier ordre par rapport à l'oxygène (forme dite michaélienne d'un système équivalent à un seul enzyme) : quand le degré d'oxydation est inférieur à 100 %, la vitesse maximum, paramètre V_m de l'équation n'est pas atteinte.

- Pour accéder à l'enzyme situé à l'intérieur de la cellule, l'oxygène est freiné par la diffusion dans le cytoplasme : c'est ce qui explique la modification de la caractéristique dans l'air.

La prise en considération des modifications apportées in vivo par la diffusion de l'oxygène jusqu'à son site d'utilisation, permet de rendre clair un ensemble de faits expérimentaux -"situés et datés"- alors difficilement interprétables.

BIBLIOGRAPHIE

1.- ALLEN R. D. -1961- Amiboid Movement in the Cell.- (MOISKY A. E. et BRACHET J. ed.). New-York, Academic Press, 135-216.

2.- BAENDER A., KIESE M. - 1955- Die Wirkung des Sauerstoffübertragen der Ferments in Mitochondrien aus Rattenbbern bei neidrigen Sauerstoffdrucken.- Arch. Exper. Path. u. Pharmakol., 224, 312-321.

3.- BLUM J. J., JENDEN D. J. -1957- Rate Behavior and Concentration Profiles in Geometrically Constrained Enzyme Systems.- Arch. Biochem. Biophys., 66, 316.

4.- CHANCE B. -1957- Cellular Oxygen Requirements.- Fed. Proc., 16, (3), 671-680.

5.- CHANCE B., PRING M. -1968- Logic in the Design of Respiratory Chain in : Biochemie des Sauerstoffes.-(HESS B. et STANDINGER U. J. ed.). - Berlin, Springer Verlag, 102-126.

6.- CHEVILLOTTE P. -1966- Influence des radiations lumineuses du spectre visible sur l'inhibition de la respiration des levures par l'oxyde de carbone.- Université de Lyon. Thèse 3ème cycle.

7.- CHEVILLOTTE P. -1971- Influence de la diffusion sur l'inhibition par l'oxyde de carbone.- C. R. Acad. Sc., Paris, 272, 1372-1375.

8.- CHEVILLOTTE P., CHARBONNIER M. - 1969 a- Action de l'oxyde de carbone sur la respiration du tubercule de Pomme de terre. Influence de la diffusion.- C. R. Acad.Sc., Paris, 269, 993-995.

9.- CHEVILLOTTE P., CHARBONNIER M. -1969 b- Action de l'oxyde de carbone sur la respiration du tubercule de Pomme de terre.- Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég., 15, (3), 317-326.

10.- CHEVILLOTTE P., DUCET G. -1969- Respiration du tubercule de Pomme de terre. Influence de la tension d'oxygène sur des disques minces.- Physiol. Vég., 7, (3), 305-323.

11.- CLOWES F. A. L., JUNIPER B. E. -1968- Plant cells.- (Botanical Monographs 8).(BURNETT ed.). Oxford, Edinburgh, Blacwell Scientific Publications.

12.- DICK D. A. T. -1959- The rate of Diffusion of Water in the Protoplasm of Living Cells.- Exp. Cell Res., 17, 5-12.

13.- DIXON M., WEBB E. C. -1964- Enzyme.- London, Longmans (2ème ed.).

14.- DUCET G. -1961- Influence de la tension d'oxygène sur la respiration.- C. R. Acad. Sc., Paris, 252, 1385.

15.- FENICHEL I. R., HOROWITZ S. B. -1963- The Transport of non Electrolytes in Muscle as a diffusional Process in Cytoplasm.- Acta Physiol. Scand., 60, Sup. 221.

16.- GERARD R. W. -1931- Oxygen Diffusion into Cells.- Biol. Bull., 60, 245-276.

17.- GOLD H. J. -1969- Kinetics of facilitated Diffusion of Oxygen Tissue Slices.- J. Theoret. Biol., 23, 455-462.

18.- HEGNER D., GLOSSMANN H., -1965- Polarographische Messungen der Atmung bei niedrigen Sauerstoffdrucken.- Z. Naturforschg., 20, 234-244.

19.- HIGGINS J. -1959- A theoretical Study of the Kinetic Properties of sequential Enzyme Reactions.- Ph. D. Dissertation. University of Pennsylvania.

20.- HILL A. V. -1929- The Diffusion of Oxygen and lactic Acid through Tissue.- Proc. Roy. Soc., (London), 104, 39.

21.- HILLS B. A. -1968- Linear bulk Diffusion into heterogeneous Tissue.- Bull. of Mathem. Biophys., 30, 47-59.

22.- HILLS B. A. -1970- Respiration of Tissue as a Medium of heterogeneous Permeability.- Bull. Math. Biophys., 32, 219-235.

23.- KEYNES R. D. -1954- The ionic Fluxes in Frog Muscle.- Proc. Roy. Soc., (London), 142, 359-382.

24.- KREUZER F. -1970- Facilitated Diffusion of Oxygen and its possible Significance ; a Review.- Resp. Physiol., 9, 1-30. (North-Holland Publishing Company, Amsterdam).

25.- KREUZER F., HOOFD L. J. C. -1970- Facilitated Diffusion of Oxygen in the Presence of Hemoglobin.- Respir. Physiol., 8, 280-302. (North-Holland Publishing Company, Amsterdam).

26.- LINEWEAVER H., BURK D. - 1934- The Determination of Enzyme Dissociation Constants.- J. Am. Chem. Soc., 56, 658-666.

27.- LIPPE C. -1969- Urea and Thiourea Permeabilities of Phospholipid and Cholesterol Bilayer Membranes.- J. Mol. Biol., 39, 669.

28.- LONGMUIR I. S. -1957- Respiration Rate of Rat Liver Cells at low Oxygen Concentrations.- Biochem. J., 65, 378-382.

29.-LONGMUIR I. S. -1966- Tissue Oxygen Transport.- Proc. Third Intern. Conf. Hyperbaric Med.(ed. I. W. BROWN and COX G. G., Washington) Nat'l. Acad. Sci., Nat'l. Res. Counc., 46-51.

30. LONGMUIR I. S. -1971- A new Mechanism of Tissue Oxygen Transport.- 6th Europ. Conf. Microcirculation. Aalborg 1970, 3-7 (Karger, Basel 1971).

31.- LONGMUIR I. S., SUN S. -1970- A hypothetical Tissue Oxygen Carrier.- Microvas. Res., 2, 287-293.

32.- LONGMUIR I. S., MARTIN D. C., GOLD H. J., SUN S.- -1971- Non classical Respiratory Activity of tissue Slices.- Microvas. Res., 3, 125-141.

33.- LØVTRUP S., MILD K. H., BERGLUND A.- 1970- The Influence of Diffusion in the external Medium upon the Determination of Cytoplasmic Diffusion Coefficients.- J. Cell Physiol., 76, 167-174.

34.- Mac LENNAN H. -1956- The Diffusion of Potassium, Insulin and Thiocyanate in the extra-cellular Spaces of the Mammalian Muscle.- Biochim. Biopys. Acta, 21, 472-477.

35.- MAPSON L. W., BURTON W. C.-1962- The terminal Oxidase of the Potato Tuber.- Biochem. J., 82, 19-25.

36.- MASSARO T. A., FATT I. -1969- Oxygen Diffusion in large single-celled Organisms.- Bull. Mathem. Biophys., 31, 327-340.

37.- MILD K. H. -1971- The Kinetic of Diffusion between a spherical Cell and a surrounding Medium with different Diffusion Properties.- Bull. Mathem. Biophys., 33, 19-26.

38.- MOIROUD A. -1965- Influence de la tension d'oxygène sur la respiration de quelques levures. Université de Lyon, Thèse 3ème cycle.

39.- PENELOUX A., DUCET G. -1963- Influence de la tension d'oxygène sur la respiration.- Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég., 9, 1-13.

40.- PITMAN M. G. -1963- The Determination of the salt Relations of the cytoplasmic Phase in Cells of Beet Root Tissue.- Austr. J. Biol. Sc., 16, 647-668.

41.- RASHEVSKY N. -1960- Mathematical Biophysics : Physico Mathematical foundations of Biology.- (New-York, Dower Publications).

42.- REICH J. G.-1970- Parameter Estimation and Enzyme kinetic Models.- FEBS Let., 9, (5), 245-251.

43.- REINER J. M. -1959- Behavior of Enzyme Systems.- Minneapolis, Burgess, Publishing Company.

44.- REYES R. J., NEVILLE J. R. -1963- Cellular Oxygen Consumption at low Oxygen Tensions.- Aerospace Medicine, december, 1103-1106.

45.- ROSE G., QUINN J. A. -1967- Composite Membranes : The Permeation of gases through deposited Monolayers.- Science, 159, 636-637.

46.- SCHINDLER F. J. -1964- Oxygen Kinetics in the Cytochrome-oxidase Oxygen Reaction.- A Dissertation in Biophysics, University of Pennsylvania.

47.- SEIFRIZ W. -1936- Protoplasm.- New-York, Mc Graw Hill, 584.

48.- TAKAHASHI G. H., FATT I., GOLSTICK T. K. -1966- Oxygen Consumption Rate of Tissue measured by a micropolarographic Method.- J. Gen. Physiol., 50, (2), 317-335.

49.- WALD G., ALLEN D. W. -1957- The Equilibrium between Cytochrome-oxidase and Carbon monoxide.- J. Gen. Physiol., 40, 493.

50.- WARBURG O. -1923- Biochem. Z., 192, 317.

51.- WARBURG O. -1927- Uber die Wirkung von Kohlenoxyd und Stickoxyd auf Atmung und Gärung.- Biochem. Z., 189, 354.

52.- WINZLER R. J. -1941- The Respiration of Bakers' Yeast at low Oxygen Tension.- J. Cell Comp. Physiol., 17, (3).

53.- WITTENBERT J. B. -1959- Oxygen Transport. A new Function proposed for Myoglobin.- Biol. Bull., 117, 402-403.